

ANTONIO CARLOS SOBIERANSKI

**PROPOSTA DE UMA PLATAFORMA DE IMAGEAMENTO  
MICROSCÓPICO PORTÁTIL BASEADA EM HOLOGRAFIA  
DIGITAL INLINE**

CURITIBA/PR

2015

ANTONIO CARLOS SOBIERANSKI

**PROPOSTA DE UMA PLATAFORMA DE IMAGEAMENTO  
MICROSCÓPICO PORTÁTIL BASEADA EM HOLOGRAFIA  
DIGITAL INLINE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Informática, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisitos parciais ao grau de Doutor em Ciências da Informática.

Orientador: Prof.Dr.rer.nat.Aldo von Wangenheim

CURITIBA/PR

2015

---

S677

Sobieranski, Antonio Carlos

Proposta de uma plataforma de imageamento microscópico portátil baseada em holografia digital inline/ Antonio Carlos Sobieranski. – Curitiba, 2015.

151 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Informática, 2015.

Orientador: Aldo von Wangenheim .

Bibliografia: p. 139-151.

1. Holografia. 2. Processamento de imagens - Técnicas digitais. 3. Diagnóstico por computador. I. Universidade Federal do Paraná. II. Wangenheim, Aldo von. III. Título.

CDD: 621.3675

---



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná

Programa de Pós-Graduação em Informática

### PARECER

Nós, abaixo assinados, membros da Banca Examinadora da defesa do aluno de Doutorado em Ciência da Computação, Antonio Carlos Sobieranski, avaliamos a tese de doutorado intitulada *“Proposta de uma Plataforma de Imageamento Microscópio Portátil baseada em Holografia Digital Inline”*, cuja defesa pública foi realizada no dia 29 de janeiro de 2015, às 14:00 horas, na sala de Web-Conferência do núcleo da RUTE - Rede Universitária de Telemedicina, Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Após avaliação, decidimos pela:

☒ aprovação do candidato. ( ) reprovação do candidato.

Curitiba, 29 de janeiro de 2015

Prof. Dr. Aldo von Wangenheim  
PPGINF/UFSC – Orientador

Profa. Dra. Regina Juci Machado Traina  
USP – Membro Externo

Prof. Dr. Daniel Tavora de Queiroz Cobra  
Fundação Certi – Membro Externo

Prof. Dr. Eros Comunello  
UNIVALI – Membro Externo

Prof. Dr. Luciano Silva  
DINF/UFPR – Membro Interno

Prof. Dr. André Luiz Pires Guêdes  
DINF/UFPR – Membro Interno





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar meus agradecimentos ao meu orientador Prof.Dr.rer.nat Aldo von Wangenheim, por conceder a oportunidade de ingressar no Instituto Nacional para Convergência Digital (INCoD), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Professor Aldo é um excelente pesquisador em diversos campos da Visão Computacional e Processamento Digital de Imagens, e nossas discussões sempre foram bastante produtivas. Professor Aldo possui a capacidade de oferecer soluções impensáveis para problemas computacionais bastante complexos, onde alguns destes podem ser considerados mais arte do que ciência.

Ao Dr.Eros Comunello, que sempre foi mais que um mentor no crescimento acadêmico e profissional, o meu sincero agradecimento por todo este tempo que compartilhamos juntos. Ao Dr.Daniel Cobra da Fundação CERTI, que também foi mais que importante em conceder a oportunidade de participar em seus projetos. Muito me agradou todo o apoio que obtive do Dr.Daniel em relação ao projeto e os direcionamentos futuros enquanto pesquisa, e ao CNPq pelo auxílio financeiro na pesquisa, processo 211472/2012-3.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão ao Dr.Utkan Demirci do BAMM Labs Laboratories na Harvard-MIT Division of Health, Science and Technology division (HST), em Cambridge-MA. Sem seu suporte não seria possível experimentar a excitante área do imageamento por holografia digital. Dr.Demirci é um excepcional cientista, e seu laboratório e grupo de pesquisadores opera em uma atmosfera muito positiva. Pesquisadores de diferentes áreas de aplicação e com conhecimento diversificado estão em constante colaboração para a solução de problemas do mundo real. Todas as discussões com Dr.Demirci a cerca do trabalho desenvolvido sempre foram muito proveitosas, e sempre me foi concedida a liberdade de investigar novas soluções tecnológicas e aplicações no período em que compartilhamos experiências.

Da mesma forma agradeço a todos os meus amigos e colegas de laboratório Leandro Coser, Mathias Webber, Adiel Mittmann, Sylvio Mantelly, Thiago Rateke, Luis Decker e

Luis Ramos, e demais integrantes, a minha gratitude pelos momentos de descontração e seriedade. Aos colaboradores no BAMM Labs Fatih Inci, Cumhur Tekin, Sinan Guven, Pu Chen, o meu obrigado pela acolhida e auxílio na pesquisa. Estes sempre me proveram preciosos conselhos e generosidade gratuita para as mais diversas situações.

Por fim, a mais das importantes, minha querida esposa e companheira Cristiane, pelo partilha e vivência ao longo de 10 anos ao meu lado. Você é a minha fonte de inspiração em todos os momentos, e a ti o meu eterno amor e carinho incondicional. Pela Cristiane que existe a empolgação de viver e lutar pelas conquistas. Para a minha família, pais e irmãos de minha parte ou de minha esposa, o meu agradecimento por tudo o que fizeram por mim.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xiii</b>
<b>ABREVIATURAS E NOTAÇÕES</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xviii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Contextualização . . . . .	3
1.2 Motivação e Hipótese . . . . .	6
1.3 Objetivos . . . . .	9
1.4 Contribuição . . . . .	9
1.5 Estrutura da Tese . . . . .	10
<b>2 HOLOGRAFIA DIGITAL E IMAGEAMENTO SEM-LENTES</b>	<b>12</b>
2.1 Fundamentos da Holografia . . . . .	14
2.1.1 Contextualização . . . . .	14
2.1.2 Teoria da Difração . . . . .	19
2.1.3 Métodos de Difração Escalar . . . . .	24
2.1.3.1 Convolução de Fresnel (Huygens) . . . . .	26
2.1.3.2 Transformada de Fresnel . . . . .	28
2.1.3.3 Método do Espectro Angular . . . . .	29
2.1.3.4 Comparação dos Métodos de Difração Escalar . . . . .	30
2.1.4 Relação com Wavelets do Filtro de Gabor . . . . .	31
2.2 Holografia de Gabor <i>Inline</i> . . . . .	36
2.3 Imageamento Sem-lentes . . . . .	40

2.3.1	Sensores para Imageamento Sem-Lentes . . . . .	42
2.3.2	Classificação dos Sistemas de Imageamento Sem Lentes . . . . .	47
2.3.3	Imageamento baseado em Iluminação Incoerente . . . . .	49
2.3.4	Imageamento baseado em Iluminação Coerente . . . . .	52
2.3.5	Imageamento baseado em Iluminação Parcialmente Coerente . . . . .	56
2.3.6	Outras Plataformas de Imageamento Sem-Lentes . . . . .	59
<b>3</b>	<b>PLATAFORMA HOLOGRÁFICA INLINE PROPOSTA PARA O IMA- GEAMENTO SEM LENTES</b>	<b>60</b>
3.1	Plataforma Holográfica de Microscopia Baseada em Múltiplos Frames . . .	61
3.1.1	Descrição Experimental do Setup . . . . .	61
3.1.2	Abordagem de Melhoramento de Resolução em Multi-Frame . . . .	68
3.1.2.1	Registro das Imagens Holográficas . . . . .	72
3.1.2.2	Modelos Variacionais para Minimização de Energia . . . .	78
3.1.2.3	Algoritmo para Minimização da Função Custo . . . . .	82
3.2	Plataforma Holográfica de Microscopia para Processamento em Vídeo . . .	87
3.2.1	Descrição Experimental do Setup . . . . .	88
3.2.2	Abordagem de Processamento Holográfico em Vídeo . . . . .	89
3.3	Método Numérico para Difração Escalar . . . . .	92
<b>4</b>	<b>RESULTADOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>97</b>
4.1	Plataforma Holográfica em Multi-frame . . . . .	98
4.1.1	Preparação das Amostras . . . . .	98
4.1.2	Resultados da Abordagem em Multi-Frame para Melhoramento da Resolução . . . . .	99
4.1.3	Validação e Análise Microscópica . . . . .	109
4.2	Plataforma Holográfica para Processamento em Vídeo . . . . .	121
4.2.1	Ambiente Experimental de Amostras Biológicas I . . . . .	123
4.2.2	Ambiente Experimental de Amostras Biológicas II . . . . .	126

<b>5 CONCLUSÃO E DISCUSSÕES</b>	<b>134</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>139</b>

## LISTA DE FIGURAS

1.1	Microscópio eletrônico convencional, equipado com lentes e restrito a ambiente específico de baixa iluminação. . . . .	2
1.2	Diferenças entre assinaturas especiais (white-LED) e holograma (UV-Laser). . . . .	4
2.1	Configuração padrão encontrada em um microscópio convencional (adaptado de <i>LynceeTec</i> – <a href="http://www.lynceetec.com/">www.lynceetec.com/</a> ). . . . .	15
2.2	Configuração padrão de um microscópio holográfico em (a). Pela ausência do feixe do objeto, a réplica do mesmo objeto é obtida em (b) (adaptado de <i>LynceeTec</i> – <a href="http://www.lynceetec.com/">www.lynceetec.com/</a> ). . . . .	17
2.3	Feixe de luz interceptando uma partícula, onde quatro efeitos podem ser verificados: difração, refração, reflexão e absorção. . . . .	20
2.4	Mudanças de comportamento para ondas planares quando aberturas ou obstáculos são encontrados. Em (a)–(b) ondas de menor comprimento são utilizadas em relação às ondas de maior comprimento demonstradas em (c)–(d). Em (e) caso particular para múltiplas aberturas numéricas e efeito produzido pela interferência da luz. . . . .	21
2.5	Difração de uma onda monocromática com comprimento de onda $\lambda$ a partir do plano de entrada $\Sigma_0$ e o plano de destino $\Sigma$ . Ao longo de $z$ , a onda intercepta uma partícula esférica, projetando interferências no plano de destino. . . . .	23
2.6	Difração do logo UFPR que está localizado no plano de entrada $\Sigma_0$ e projeção das interferências no plano de destino $\Sigma$ localizado a uma distância $z$ . . . . .	25
2.7	Difração pela convolução de Fresnel do plano de entrada em (a), considerando diferentes distâncias de planos. . . . .	27
2.8	Partes reais e imaginárias de uma <i>Wavelet</i> . . . . .	33
2.9	$\phi = 0$ (cima – $\Re$ ) e $\phi = \pi/2$ (baixo – $\Im$ ) para diferentes faixas de $\sigma$ . . . . .	34

2.10	Exemplo de banco de filtros de Gabor com $\sigma = [1 - 10]$ e $\theta = [0 - 180]^\circ$ – parte imaginária. . . . .	35
2.11	Representação esquemática da holografia <i>inline</i> de Gabor. Um laser $L$ é utilizado para focar uma abertura numérica $P$ (pinhole). Ondas esféricas são obtidas e objeto $O$ é iluminado, gerando padrões de interferências holográficas, que são capturadas pelo sensor $C$ . . . . .	38
2.12	Artefatos gerados pela difração numérica devido ao problema da imagem gêmea. O objeto real é interceptado por ondas planares ou esféricas e o holograma é gerado a uma distância $z$ . A difração numérica é realizada com base na mesma distância $z$ do plano ao objeto real. Como a holografia é <i>inline</i> , artefatos do objeto real ocorrem na imagem virtual. . . . .	40
2.13	Câmera industrial do fabricante Imperx acoplada a conjunto óptico (lado direito), e sensor de imagem por CCD embarcado na câmera (lado esquerdo). . . . .	44
2.14	Câmera industrial do fabricante <i>The Imaging Source</i> (direita) acoplada a conjunto óptico, e sensor de imagem por CMOS correspondente (esquerda). . . . .	45
2.15	Demonstração de sistemas de iluminação coerente e incoerente. Após filtradas por uma abertura numérica e um filtro de comprimento de ondas, o feixe apresenta coerência espacial e temporal. . . . .	48
2.16	Exemplo de magnificação dos padrões holográficos sob a mesma escala. Em (a) o objeto é posicionado diretamente sobre o plano detector, e em (b) uma distância de 2 – 2.4 mm foi utilizada. Os gradientes de cada holograma correspondem a (c) e (d), respectivamente. . . . .	54
3.1	Descrição dos componentes utilizados para a plataforma holográfica proposta para a captura de múltiplos <i>frames</i> da amostra. . . . .	63
3.2	Protótipo da plataforma holográfica de microscopia e partes componentes. Em (a) sistema de iluminação e base de deslocamento do sistema de iluminação. Em (b), base da plataforma com sensor de imagem acoplado. Em (c) controle de intensidade do sistema de iluminação. . . . .	64

3.3	Protótipo da plataforma holográfica de microscopia e partes componentes sob diferente ponto de vista. . . . .	66
3.4	Resultado da aquisição de hologramas em células reprodutoras masculinas, com o deslocamento da fonte luminosa no eixo vertical. . . . .	67
3.5	Hologramas obtidos pela plataforma holográfica proposta submetidos ao deslocamento da fonte de iluminação. Para efeitos de comparação a informação em nível de <i>pixel</i> é apresentada. . . . .	70
3.6	Diagrama de fluxo da plataforma holográfica proposta com o objetivo de melhoramento da resolução e supressão de ruído. Após a obtenção de hologramas em alta-resolução, métodos numéricos de difração convertem o sinal em informação morfológica do plano-objeto. . . . .	71
3.7	Registro do holograma de referência (esquerda) com hologramas candidatos (direita). Região em destaque corresponde ao deslocamento dos vetores de característica. . . . .	76
3.8	Resultado do método de registro inicial utilizado na abordagem proposta. Em (a) exemplo da diferença de uma imagem $C$ em relação a $R$ . Em (b) diferença de <i>pixels</i> pós-registro. Em (c), mapa de deslocamento do sistema de iluminação para todo o conjunto de baixa-resolução. . . . .	77
3.9	Exemplo do nível de <i>sharpness</i> para soluções candidatas distintas. . . . .	86
3.10	Protótipo da plataforma sem lentes desenvolvida para processamento em vídeo holográfico. . . . .	88
3.11	Controle de iluminação utilizando um Arduino Uno e LED laser vermelho de baixo custo. . . . .	90
3.12	Diagrama geral da plataforma microscópica para vídeo holográfico. . . . .	91
3.13	Demonstração do imageamento holográfico <i>in-situ</i> de micro-organismos existentes em uma gota de água. . . . .	92
3.14	Holograma original decomposto nas parte real ( $\Re$ ) e imaginária ( $\Im$ ). A partir de $\Re$ e $\Im$ , fase ( $\theta$ ) a amplitude ( $r$ ) podem ser computadas. Sinal multi-dimensional pode ser obtido pela combinação dos sinais $\Re$ , $\Im$ , $\theta$ ou $r$ . . . . .	93



3.15	Exemplo de difração de um sinal holográfico de células reprodutoras masculinas. Da primeira para a terceira coluna é demonstrado a parte $\Re$ , $\Im$ e a composição do sinal $C$ , respectivamente. Valores de difração são $z = 30k, 45k, 60k, \approx 70k$ . . . . .	94
3.16	Utilização do índice LAPM como métrica para o ajuste automatizado do ponto de foco de difração em sinais holográficos. . . . .	96
4.1	Compasso de <i>Prewitt</i> aplicado sobre hologramas do conjunto de baixa-resolução e sobre o holograma em alta-resolução resultante. As setas nos hologramas de baixa resolução indicam ruído, que é suprimido na imagem em alta-resolução. . . . .	100
4.2	Comparação dos sinais holográficos obtidos pela plataforma holográfica proposta. Ao lado esquerdo e direito, hologramas de baixa resolução e a reconstrução obtida a partir de múltiplas imagens são demonstradas, respectivamente. . . . .	102
4.3	Comparação de sinais holográficos em baixa resolução (a) em relação a mesma imagem, reconstruída a partir de um conjunto de múltiplas imagens (b). Linhas em verde e vermelho para ambas as imagens indicam a mensuração das intensidades de gradiente para os hologramas, respectivamente, conforme Figura 4.4. A seta em vermelho em (a) indica hologramas suprimidos na imagem em alta-resolução. . . . .	104
4.4	Mensuração das intensidades de gradiente realizada através das linhas verde e vermelho, demonstradas na Figura 4.3. É possível verificar que a imagem de alta-resolução apresenta sinal com maior regularidade e discriminação do sinal, bem como efeito de propagação da onda. . . . .	104
4.5	Comparação de sinais holográficos em baixa resolução (a) em relação a mesma imagem, reconstruída a partir de um conjunto de múltiplas imagens (b). Linhas em verde e vermelho indicam a mensuração das intensidades de gradiente para os hologramas em baixa e alta-resolução, respectivamente, conforme Figura 4.6. . . . .	106

4.6	Mensuração das intensidades de gradiente realizada através das linhas verde e vermelho, demonstradas na Figura 4.5. O gráfico demonstrado neste exemplo apresenta uma maior discriminação para os picos de gradiente, bem como constância e periodicidade para o sinal holográfico. . . . .	106
4.7	Análise quantitativa do sinal holográfico para a plataforma proposta. Para a primeira e segunda coluna, hologramas e baixa e alta-resolução são apresentados, respectivamente. Acima de cada conjunto de hologramas, o gráfico das intensidades relativas dos <i>pixels</i> das linhas vermelha e verde são apresentados, correspondendo às medições dos hologramas em baixa e alta-resolução. . . . .	107
4.8	Análise quantitativa do sinal holográfico para a plataforma proposta. Para a primeira e segunda coluna, hologramas e baixa e alta-resolução são apresentados, respectivamente. Acima de cada conjunto de hologramas, o gráfico das intensidades relativas dos <i>pixels</i> das linhas vermelha e verde são apresentados, correspondendo às medições dos hologramas em baixa e alta-resolução. . . . .	108
4.9	Procedimento adotado para a validação das imagens holográficas. . . . .	109
4.10	Comparação dos resultados obtidos pela plataforma holográfica proposta em <i>multi-frame</i> (lado esquerdo) e confirmação microscópica (lado direito). O holograma decodificado demonstra o sinal de amplitude para a imagem apresentada. A confirmação microscópica foi obtida utilizando um microscópio óptico convencional com recurso de mosaico. . . . .	111
4.11	Comparação do sinal de composição $C_{rgb}$ em relação a confirmação microscópica, apresentadas ao lado esquerdo e direito, respectivamente. . . . .	112
4.12	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	113

4.13	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	114
4.14	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	115
4.15	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	116
4.16	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	117
4.17	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	118
4.18	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	119
4.19	Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição $C_{rgb}$ da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica. . .	120
4.20	Amostras de fluido contendo nematóides em escala microscópica. Ao lado esquerdo, assinaturas holográficas dos vermes são apresentadas, ao lado direito, difração numérica considerando o sinal de amplitude. . . . .	123
4.21	Nematóides em vídeo imageados através da plataforma holográfica proposta (superior). Microscopia de Nematóide hermafrodita adaptada de <i>WormAtlas</i> (inferior). . . . .	124

4.22	Amostras de fluido contendo algas-verde em escala microscópica. Lado esquerdo imagem de amplitude após difração numérica. Lado direito representação de uma imagem de microscopia. . . . .	125
4.23	Amostras de fluido contendo algas-verde em escala microscópica. Parte superior, imagem de amplitude após difração numérica. Parte inferior representação de uma imagem de microscopia. . . . .	126
4.24	Amostras de fluido contendo Rotíferas em escala microscópica. Ao lado esquerdo, assinaturas holográficas são apresentadas, enquanto que ao lado direito, difração numérica considerando o sinal de amplitude é demonstrada.	127
4.25	Rotíferas em vídeo holográfico, imageadas através da plataforma proposta (superior). Microscopia demonstrando morfologia de uma Rotífera é demonstrada (inferior). . . . .	128
4.26	Visualização de platelmintos (planária) pela plataforma holográfica proposta. Lado esquerdo e direito superior, holograma original e difração numérica no sinal de amplitude, respectivamente. Inferior, representação microscópica de um platelminto. . . . .	129
4.27	Visualização de platelmintos em movimentação livre no meio fluídico, capturados através da plataforma holográfica proposta. . . . .	130
4.28	Protozoários observados através da plataforma holográfica em vídeo proposta. Sinal multi-dimensional $C_{rgb}$ é utilizado na parte superior. Confirmação microscópica é demonstrada nas figuras da parte inferior. . . . .	131
4.29	Movimentação de rotíferas em vídeo holográfico, em ambiente livre no meio fluídico. . . . .	132
4.30	Movimentação de platelmintos em vídeo holográfico, em ambiente livre no meio fluídico. . . . .	133

## LISTA DE TABELAS

1.1	Principais diferenças para o diagnóstico em <i>Point-of-Care</i> (POC) e diagnóstico convencional. . . . .	2
2.1	Comparação dos métodos de difração. . . . .	31



## ABREVIATURAS E NOTAÇÕES

ASM	<i>Angular Spectrum Method</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Devices</i>
CMOS	<i>Complementary Metal-oxide-semiconductors</i>
DFT	<i>Discrete Fourier Transform</i>
DIH	<i>Digital Inline Holography</i>
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
FOV	<i>Field-of-View</i>
<i>fps</i>	<i>Frames per Second</i> (frame-rate de um sensor de imageamento)
LED	<i>Light-emitting Diode</i>
POC	<i>Point-of-Care</i>
PSF	<i>Point-spread-function</i>
PDE	<i>Partial Differential Equations</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
$E$	Função de energia ou valor de erro
$I$	Imagem de entrada $m$ -dimensional
$\lambda$	Comprimento de onda de um feixe
$m$	Dimensionalidade de um espaço
$n$	Cardinalidade de um vetor
$nm$	Medida em nanômetros
$\mu m$	Medida em micrômetros
$\mu$	Valor de média qualquer
$\Omega$	Um conjunto aberto ou partição, onde $\Omega \subset I$
$\sigma$	Desvio padrão
$\theta$	coeficiente angular
$\nabla f$	Gradiente no senso clássico
ROI	Região de interesse ou área retangular
SIFT	<i>Scale-Invariant Feature Transform</i>
SURF	<i>Speeded Up Robust Features</i>

## RESUMO

Nesta tese o desenvolvimento de tecnologias de imageamento sem-lentes utilizando o conceito de holografia digital *inline* para o enfoque microscópico é apresentado. Na formação de imagem sem lentes, o princípio do imageamento por sombras é utilizado, onde as amostras são iluminadas por uma fonte de luz, e sombras contendo as assinaturas das partículas no plano-objeto são projetadas e capturadas em um meio detector eletrônico. Pelo uso de um sistema espacialmente e temporalmente coerente de iluminação, o princípio da difração de onda é aplicado, e assinaturas de padrões de interferências holográficas são projetadas ao invés de somente sombras com assinaturas espaciais. Este conceito denomina-se de holografia digital *inline*, e métodos numéricos são requeridos para a conversão do sinal holográfico em informação morfológica do plano-objeto.

Embora explorada bastante recentemente, a holografia digital *inline* possibilita horizontes para uma vasta gama de aplicações que envolvem a miniaturização de microscópios em plataformas portáteis, que por sua vez são facilmente integradas com recursos computacionais. Nesta tese de doutorado são propostas 2 plataformas distintas baseadas em holografia digital *inline*: (i) plataforma holográfica com melhoramento da resolução das assinaturas holográficas por meio de técnicas de super-resolução, (ii) plataforma holográfica para o processamento de vídeo em altas taxas de amostragem.

A primeira plataforma é baseada na premissa do deslocamento da fonte luminosa, realizando a computação de uma imagem holográfica em alta-resolução a partir de um conjunto de múltiplas observações da mesma cena. Métodos de registro das imagens holográficas são utilizados, seguidos por um procedimento de otimização do alinhamento inspirado em modelos variacionais de energia. Um *framework* bio-inspirado é utilizado para minimizar a função em relação a um termo de fidelidade e uma medida de *sharpness*, e encontrar a solução de ótimo global de alinhamento das imagens. A cena é aproximadamente planar, e somente amostras estáticas são utilizadas neste contexto. Para os hologramas em alta-resolução, métodos computacionais numéricos baseados em recupe-



ração de fase são aplicados para difração do sinal de onda e recuperar as informações geométricas da amostra analisada. A plataforma holográfica foi validada com amostras biológicas de células humanas reprodutoras masculinas, onde a confirmação microscópica foi obtida através de um microscópio óptico convencional, apresentando alta correlação com a imagem de campo de brilho (*bright-field*). Os resultados obtidos mostram uma resolução espacial de  $\approx 1\mu m$  sobre um campo máximo de visão de  $\approx 30mm^2$ . Diferentemente das abordagens descritas da literatura, somente uma fonte de iluminação é utilizada para melhoramento da resolução, bem como os métodos de registro e minimização são especificamente designados para incrementar o sinal holográfico da propagação da onda.

A segunda plataforma apresenta como enfoque a visualização de amostras biológicas *in-situ*, como uma ferramenta de propósito geral de imageamento em meio fluídico. A plataforma para vídeo holográfico é mais simples que a plataforma com melhoramento de resolução, e esta pode ser miniaturizada em apenas alguns centímetros cúbicos com resolução de algumas frações de micrômetros. Os experimentos nesta plataforma foram conduzidos principalmente na inspeção de micro-organismos existentes em amostras de água, onde uma série de espécimens podem ser verificados. A vantagem de uma plataforma holográfica em vídeo é o imageamento de estruturas em 4D (volume e tempo), onde um simples vídeo pode ser analisado repetidamente em diferentes pontos de difração.

**Palavras-chave:** Holografia Digital *inline*, Super-Resolução em Multi-Frame, Vídeo Holográfico, Plataformas de Diagnóstico em *Point-of-Care*, Imageamento Sem-Lentes.

## ABSTRACT

In this doctoral's dissertation, lensless imaging technologies based on the digital inline holography concept were developed for the biological microscopy context. From a lensless image formation point-of-view, the shadow imaging principle is used, where the samples are illuminated by a light-source, and shadows containing particle's signatures are projected from the object-plane to an electronic detector. By using a temporal and spatial coherent illumination system, the diffraction-wave principle is applied, and interference holographic patterns are projected, instead of simple spatial signature shadows only. This concept is the so-called digital inline holography, and numerical methods should be used to convert holographic signals into morphological details of the object-plane.

Digital inline holography has been explored very recently, opening a wide range of new applications involving the miniaturization of imaging devices into portable platforms, that can be easily integrated with computational resources. In this doctoral's dissertation two distinct platforms based on digital inline holography are presented: (i) holographic platform based on resolution improvement of the holographic signatures, (ii) holographic platform for video processing using high-frame rate sampling.

The first platform is based on the premise of computing a higher resolution holographic image from a set of multiple observations of the scene. Image registration methods for the holographic images are used, followed by an optimization approach inspired on variational models of energy equation. A bio-inspired framework is used to minimize this function based on a fidelity term and a sharpness measure, and its minimization is used to find a global optimum solution for the alignment problem. The scene is approximately planar, and static samples can be imaged in this platform. For the high-resolution holograms, numerical diffraction methods are used to recover the phase information, and consequently the morphological information of the analyzed sample. The holographic platform was validated using biological human samples corresponding to reproductive male cells (sperm) using a conventional optical microscope, showing a high correlation with the

bright-field microscopy image. The obtained results show a spatial resolution of  $\approx 1\mu m$  in a field-of-view corresponding to  $\approx 30mm^2$ . Differently from the state-of-the-art approaches, this method is based on a single shifted light-source where arbitrary displacements are registered into a single frame, using a combined optimization approach.

The second approach has the biological visualization of *in-situ* specimens in focus. This platform is presented as a generic tool for the visualization of live microorganism in a fluidic mean, being simpler than the previously described platform. On the other hand, this platform can be easily miniaturized into a few cubic centimetres, having resolution of a few microns. Experimental results in this platform were conducted based on the inspection of free-living microorganism in water samples, where several specimens can be observed. A goal of this video holographic platform is the 4D imaging (volume over time), where a single captured video can be repeatedly analyzed for different object-plane diffraction distances.

**Keywords:** Digital Inline Holography, Multi-Frame Super-Resolution, Holographic Video, Point-of-Care Diagnostic Platforms, Lensless Imaging.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

Imageamento em micro-escala nas ciências da vida por um longo período de tempo tem sido conduzido por microscópios convencionais, equipados por alguma óptica geométrica [1]. A história da sua evolução está diretamente relacionada com a necessidade de observação de estruturas celulares, importantes para as áreas da biologia celular e a medicina. Com o advento do princípio da holografia em 1948 por Dennis Gabor [1, 2], microscópios por elétrons de alta-resolução foram desenvolvidos, oferecendo uma ampla gama de investigação não apenas em escala microscópica, mas também para investigação em nano-escala. No entanto, instrumentos tecnológicos de imageamento em geral podem requerer uma infra-estrutura bastante avançada, e na maioria dos casos podem acabar sendo restritos a clínicas e hospitais especializados. Conforme representado pela Figura 1.1, embora de uso laboratorial, o microscópio apresentado não pode ser facilmente portátil para outros ambientes, e necessita de infra-estrutura preparada com baixa iluminação ambiental para operação.

Especialmente em países em desenvolvimento ou com limitações de recursos, dispositivos de imageamento de baixo custo, confiáveis e de fácil manuseio são requeridos para o pronto atendimento, tornando-se soluções muito atrativas para o tratamento e diagnóstico de uma série de doenças [3, 4, 5]. Estes dispositivos para o pronto atendimento independente de local e com poucas restrições de operacionalização, são denominados internacionalmente de dispositivos de *Point-of-Care* (POC).

Dispositivos de POC tem atraído a atenção da Organização Mundial da Saúde (WHO), onde algumas premissas básicas foram apresentadas para dispositivos de POC portáteis, inserindo-se neste caso, dispositivos de imageamento biológico. Estes dispositivos devem ser de baixo custo, fácil operação e robustos de operação mesmo sob condições adversas de ambiente [6, 7, 8]. Em termos de efetividade, dispositivos para POC devem operar

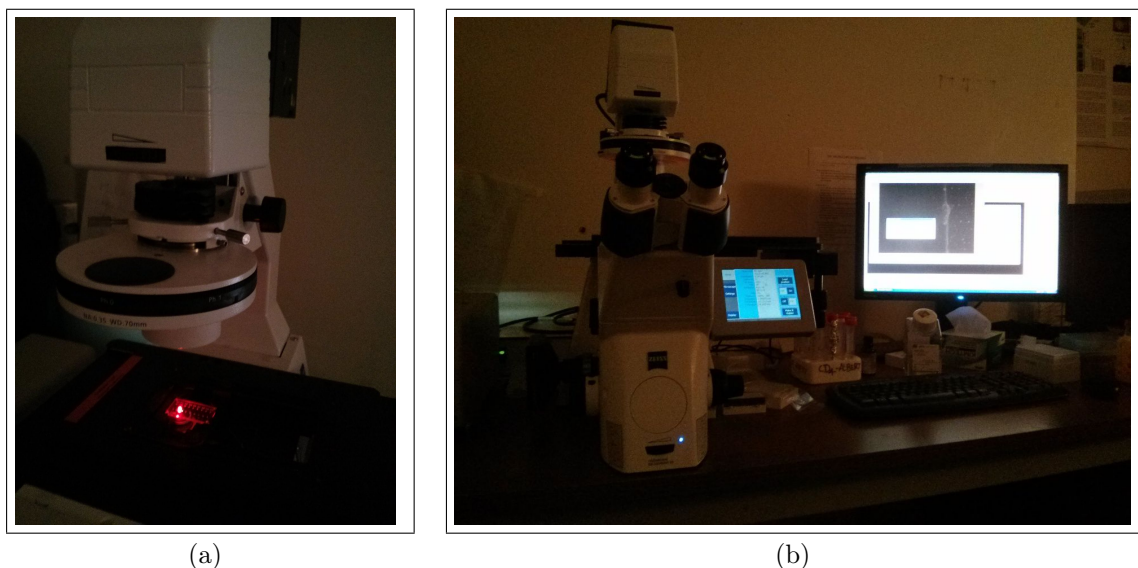


Figura 1.1: Microscópio eletrônico convencional, equipado com lentes e restrito a ambiente específico de baixa iluminação.

dentro de uma sensibilidade clinicamente aceitável, mesmo sem um extensivo treinamento técnico por parte do operador do dispositivo [9, 10, 11, 12].

Tabela 1.1: Principais diferenças para o diagnóstico em *Point-of-Care* (POC) e diagnóstico convencional.

	Diagnóstico com POC	Diagnóstico Convencional
<b>Custo</b>	Baixo custo, descartável	Elevado custo de aquisição e manutenção
<b>Funcionalidade</b>	Único diagnóstico por chip	Múltiplas leituras possíveis
<b>Treinamento</b>	Requerimento de pessoal minimamente treinados, plataforma <i>user-friendly</i>	Requerimento de pessoal altamente treinado
<b>Ambiente</b>	Funcional em altas temperaturas e umidade	Não adequado para altas temperaturas ou umidade
<b>Infra-estrutura</b>	Não requer infra-estrutura avançada e fornecimento constante de energia	Estrutura avançada é requerida e vulnerável à <i>blackouts</i>
<b>Flexibilidade de Operação</b>	Múltiplos diagnósticos com pequenas alterações na plataforma	Diferentes diagnósticos requerem plataforma específica
<b>Acessibilidade</b>	Não depende de hospital ou clínicas especializadas para entrega ao usuário final	Realizado em clínicas e hospitais estabelecidos
<b>Acurácia e Precisão</b>	Moderada a alta dependendo da aplicação	Altamente precisos

Na Tabela 1.1 as principais diferenças entre o diagnóstico realizado por um dispositivo POC em relação ao diagnóstico convencional são apresentadas [13]. Estas diferenças são baseadas nos padrões da Organização Mundial da Saúde, e pode ser observado que tais necessidades impõem desafios e requerem abordagens inovadoras para a promoção de tecnologias voltadas ao diagnóstico em POC.

## 1.1 Contextualização

Como uma alternativa aos microscópios convencionais, onde fótons no feixe de luz interagem com a amostra a ser analisada e padrões geométricos são capturados por um sensor, o princípio do imageamento por sombra pode também ser implementado em uma plataforma de POC. Imageamento por sombra é uma técnica bastante simples cujo princípio de trabalho é iluminar espécimens para posterior captura das assinaturas espaciais (sombras) com um sensor posicionado no lado oposto [14, 15]. A investigação do espécimen é então realizada diretamente sobre a superfície do sensor, onde as imagens são obtidas sem qualquer requerimento de lentes [16, 17, 18]. Pela utilização de um sistema coerente de iluminação, *i.e.*, pela filtragem dos feixes através de aberturas numéricas na ordem do comprimento da luz, o princípio da holografia de Gabor pode ser reproduzido. Assinaturas espaciais são convertidas para padrões de interferência holográfica, de modo que, pequenos detalhes morfológicos das amostras são codificados juntamente com as assinaturas de sombra no sensor.

Desta forma, tecnologias de imageamento sem-lentes podem ser principalmente categorizadas de acordo com as propriedades temporais e espaciais do sistema de iluminação, sendo: (a) holografia digital *inline* (DIH) utilizando um sistema de iluminação coerente; (b) assinaturas espaciais ou simplesmente imageamento incoerente sem-lentes *On-Chip*; (c) uma categoria intermediária entre (a) e (b), denominada de holografia digital *inline* parcialmente coerente. Exemplo da influência de diferentes tipos de fonte de iluminação para o imageamento sem lentes é demonstrado através da Figura 1.2. Em (a), um diodo de luz branca foi utilizado, onde somente assinaturas espaciais foram projetadas devido ao fato da luz branca ser composta de diferentes comprimentos de onda. Isso deve-se ao fato de comprimentos de onda diferentes, ao interceptarem partículas, serem deslocados para locais distintos no plano imageador, produzindo assim um efeito de esmaecimento das assinaturas espaciais sobre o sensor. Na Figura 1.2-(b), uma iluminação monocromática, *i.e.*, de mesmo comprimento de onda, foi utilizada, sendo esta composta de um diodo ultra-violeta com comprimento de onda de 385 nm. Observa-se que, como o comprimento de onda é o sempre o mesmo, as ondas monocromáticas ao interceptarem a

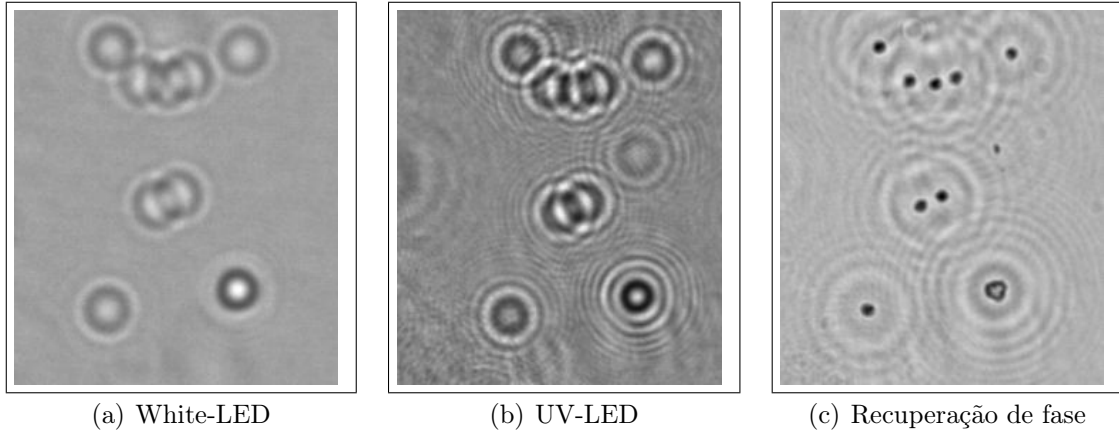


Figura 1.2: Diferenças entre assinaturas especiais (white-LED) e holograma (UV-Laser).

partícula tendem a serem projetadas para o mesmo local de acordo com a topologia do objeto interceptado. O sensor de imageamento desta forma recebe as assinaturas com maior regularidade, apresentando o efeito de franjas em torno da partícula correspondente às frequências produzidas pelas interferências dos padrões holográficos. Este efeito é determinado pelas leis físicas da teoria da difração, e quanto melhor a qualidade do sinal holográfico produzido, melhores serão os detalhes codificados nos padrões holográficos [19]. Obviamente, assinaturas holográficas precisam ser decodificadas para o princípio se tornar prático, e métodos numéricos de recuperação de onda são empregados para perfazer o caminho realizado pela onda, e obter a morfologia original do objeto interceptado [20]. Na Figura 1.2-(c) o processo numérico de recuperação da onda é demonstrado, através da decodificação dos padrões holográficos da imagem em (b). Este processo possibilita o melhoramento significativo na resolução da imagem, uma vez que pela projeção de assinaturas espaciais somente pontos difusos podem ser obtidos, não armazenando nenhuma informação geométrica do objeto. A partir da imagem reconstruída em (c), métodos numéricos de difração de onda podem ser utilizados para recuperar os aspectos morfológicos da amostra a ser analisada, e então análises quantitativas (forma, categoria) e qualitativas (número de células, tamanho) do espécimen podem ser realizadas.

Com os recentes avanços na tecnologia em nano-escala, um progresso significativo em sensores de imageamento baseados em dispositivos de carga acoplada (CCD) e semicondutor metal-óxido complementar (CMOS) foram alcançados. Atualmente, sensores

de imageamento com configurações bastante atrativas em alta-resolução, alta taxa de amostragem e amplo campo de visão (FOV) estão disponíveis na indústria. CMOS é uma tecnologia com custo significativamente inferior aos sensores por CCD, e ainda existe uma grande perspectiva de melhoramento contínuo demandada pela indústria mobile (tablets e smartphones), uma vez que podem ser facilmente miniaturizados. Estes avanços tecnológicos estão possibilitando o desenvolvimento plataformas portáteis, efetivas e de baixo custo, de modo que a micro-eletrônica e a micro-fluídica pode ser integrada na mesma plataforma de imageamento.

Não obstante, melhoramentos computacionais tanto em hardware como software também estão contribuindo significativamente para o desenvolvimento de uma nova geração de dispositivos de imageamento para aplicações de POC. Os sensores recentemente desenvolvidos possibilitam o acesso ao dado e instruções de uma maneira bastante direta. O desenvolvimento de métodos computacionais de análise automatizada integrados à aquisição tem se tornados possíveis para uma mesma plataforma. O poder computacional das modernas unidades centrais de processamento (CPU e GPU) executando instruções em paralelo estão permitindo o uso efetivo de técnicas de Processamento Digital de Imagens (DIP) e Reconhecimento de Padrões (RP), previamente restritas por limitações computacionais. Como exemplo, (i) robustos filtros não-lineares necessários para a redução de ruído e ao mesmo tempo preservar descontinuidades durante a aquisição podem ser utilizados durante a aquisição [21][22]; (ii) métodos de segmentação de imagens elaborados para reduzir o conteúdo e simplificar a imagem de entrada em particionamentos representativos podem ser integrados na plataforma [21][23], (iii) métodos para a subtração de *background* para aplicações em sequências de vídeo [24] podem ser utilizados em aplicações efetivas de POC. Também aplicações de alto-nível, tal como o *tracking* de partículas no tempo [25][26], também podem ser aplicações bastante interessantes não antes desenvolvidas para POC. Por fim, verifica-se que todos os avanços tecnológicos acima mencionados, combinados com sensores de imageamento estão permitindo o desenvolvimento de poderosos sistemas de microscopia para operar sem o uso de qualquer lente ou volumosos conjuntos de componentes ópticos [27], enquanto correspondendo a performance dos microscópios



convencionais baseados em lentes.

## 1.2 Motivação e Hipótese

O princípio do imageamento por holografia avançou significativamente desde a sua invenção por Denis Gabor muitas décadas atrás [2, 1]. Embora muitos dos notáveis princípios e propriedades da holografia foram conhecidos por décadas, aplicações práticas destes conceitos foram restringidos devido aos complexos procedimentos e particularidades requeridas para a implementação do equipamento [28]. Com o advento dos modernos sensores de imageamento para armazenar a informação provida, a holografia digital emerge como uma poderosa técnica de imageamento para as ciências da vida, possibilitando o imageamento microscópico de espécimens biológicos [29].

Na literatura existe um significativo número de abordagens desenvolvidas sobre o princípio tradicional da holografia [30, 31, 32]. Em termos de POC, a holografia tradicional pode apresentar algumas limitações considerando aspectos de miniaturização. Por outro lado, muitos dos seus conceitos de difração podem ser também trazidos para a holografia digital *inline*. Devido a sua simplicidade, a holografia digital *inline* tem se tornado preferível para aplicações em POC, e esta pode ser facilmente implementada em uma plataforma miniaturizada [19]. Outro aspecto que difere a holografia *inline* é o fato de que o feixe luminoso utilizado para interceptar a amostra e projetar as assinaturas não é separado em feixe de referência e objeto, como ocorre na holografia convencional [33].

Uma das principais limitações em qualquer sistema de imageamento diz respeito à resolução. Resolução é um dos mais importantes aspectos para qualquer sistema de aquisição de imagens, e este é principalmente determinado pelo tamanho do pixel (*pixel-size*) utilizado no sensor de imageamento. Por outro lado, verificando do ponto de vista de formação de imagem, análise computacional em baixo-nível pode ser utilizada para melhorar a qualidade dos hologramas capturados. Técnicas computacionais para melhoramento da resolução podem ser aplicadas para reduzir alguns dos limites físicos computacionalmente, através da estimativa de uma imagem de alta-resolução com uma maior densidade de pixels [34, 35]. Na literatura uma imagem em alta-resolução pode ser obtida a partir da

análise de um único ou múltiplos frames da cena. Para um único frame, aspectos físicos do sensor devem ser conhecidos previamente, e uma função de espalhamento (*point-spread-function*) (PSF) é estimada para convolver a imagem e melhorar os níveis de detalhes [36, 37]. No entanto, para o caso da holografia *inline*, onde a formação da imagem é linear no campo complexo, a estimativa de uma função de espalhamento PSF pode produzir alguns cancelamentos ou outros efeitos não-lineares [38].

Resolução a partir de múltiplos frames consiste em obter uma imagem de alta-resolução pelo processo de somatória temporal de consecutivos frames [39, 40, 41]. Este tipo de melhoramento é possível devido a inconstância do ambiente ou da própria aquisição, onde variações físicas são introduzidas no tempo tal como ruído, saturação ou picos de gradiente obtidos das diferentes intensidades capturadas pelas células do sensor.

Na literatura, o uso combinado de imageamento sem-lentes por sombra (assinaturas espaciais ou holográfica) e computação de super-resolução para plataformas de imageamento para microscopia é verificado. Muitas das abordagens são dedicadas para melhorar as assinaturas holográficas pela utilização de câmeras de alta taxa de amostragem (*frame-rate*) na ordem de mil frames por segundo (*fps*). Uma pequena varredura em nível de sub-pixel é obtida, e pequenas intensidades da amostra em movimento são capturados no tempo. Estas perspectivas são realizadas através de uma pressão constante aplicada na entrada do canal de micro-fluídica, produzindo um efeito de deslocamento global de toda a amostra analisada. Embora o elevado custo de aquisição de uma câmera que atenda requisitos de alta taxa de amostragem e tamanho de pixel reduzido, esta categoria de plataforma de imageamento pode alcançar micro-resolução muito eficientemente [42, 43, 44].

Utilizando um princípio diferente para melhoramento da resolução, em um amplo FOV de  $24\text{ mm}^2$  em um sensor de imageamento convencional, um *array* de LEDs integrado a um micro-controlador foi utilizado para deslocar o ponto de foco e consequentemente as assinaturas holográficas capturadas sobre a superfície do sensor [45, 46]. Uma imagem de alta-resolução é obtida a partir de um conjunto de 23 imagens de baixa-resolução, onde registro de imagem e métodos de deconvolução são aplicados para melhoramento da imagem. A recuperação da informação de onda é realizada através de métodos iterativos

que recuperam os detalhes morfológicos da amostra. De maneira similar, a simulação do processo de recuperação de pixel obtido a partir de diferentes orientações e posições é apresentado em [31]. Utilizando um array de 25 LEDs conectados por um sistema de fibras, a luz é disparada em diferentes pontos da amostra, para compor uma imagem de alta-resolução.

Outro modelo interessante é o modelo radial tomográfico de escaneamento é apresentado para DIH volumétrica. Um microscópio tomográfico sem-lentes utilizando um sistema de iluminação parcialmente coerente foi proposto em [29, 47, 48], onde uma plataforma multi-ângulo foi desenvolvida. Utilizando a mesma plataforma, [49, 50] apresentam uma abordagem capaz de realizar a análise volumétrica das trajetórias de amostras vivas de células reprodutoras masculinas. Duas fontes sequenciais de iluminação com comprimento de onda variados foram posicionadas em planos verticais e oblíquos. Hologramas em vídeo são obtidos para posterior decodificação e rastreamento das trajetórias no volume.

No entanto, o que verifica-se, é que por ser uma área bastante recente a quantidade de campos de aplicação para a DIH é bastante ampla. Outro fato é que uma atenção significativa é ainda dada para a escala de instrumentos laboratoriais, mas relativamente poucos esforços são dados em relação a observação ou dispositivos de imageamento, tais como microscópios [27]. Neste contexto, plataformas de imageamento sem-lentes são apresentadas como soluções muito interessantes e estas podem habilitar numerosas possibilidades nas ciências biológicas. A grande vantagem desta categoria de plataforma de imageamento é o amplo FOV obtido sem o requerimento de lentes (usualmente a mesma área do sensor), mesmo com a necessidade de hardware específico composto de sensor de imageamento, sistema de iluminação e recursos computacionais para análise de imagem.

Nesta tese de doutorado uma plataforma portátil de imageamento sem-lentes para inspeção biológica é apresentada. Utilizando um sensor de imageamento CMOS convencional e os conceitos da holografia digital *inline*, aspectos de resolução e holografia em vídeo serão apresentados e discutidos neste trabalho. Diferentemente das abordagens de holografia *inline* para melhoramento da resolução propostas, uma única fonte de ilumi-

nação é utilizada para imageamento das amostras, de modo que deslocamentos planares são realizados no topo da plataforma. O processo de registro é realizado em duas etapas: um alinhamento rápido do conjunto de baixa resolução utilizando métodos baseados em características, seguido pela otimização em *sub-pixel* inspirado em modelos variacionais de energia, onde ocorre a minimização de termos penalizadores. Outro fator motivador foi a evolução da plataforma inicialmente proposta, baseada em análise estática de amostras biológicas, para a holografia em vídeo. A holografia em vídeo abre uma janela de várias aplicações computacionais e biológicas, as quais foram pouco exploradas na literatura até o presente momento.

### 1.3 Objetivos

O objetivo geral desta tese de doutorado é a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologias portáteis para o imageamento holográfico sem a utilização de lentes e complexos conjuntos ópticos, explorando aspectos de melhoramento da resolução de sinais holográficos, bem como realizar a holografia *in-situ* em vídeo de micro-organismos.

### 1.4 Contribuição

Ao término deste documento poderá ser verificado que as principais contribuições permeiam o desenvolvimento de (i) plataforma holográfica sem lentes para o imageamento estático de amostras biológicas humanas com incremento e recuperação da informação holográfica, e (ii) plataforma para holografia sem lentes em vídeo, com alta taxa de amostragem para o imageamento *in-situ* de micro-organismos. Para a plataforma baseada em melhoramento de resolução, um *pixel-size* virtual com resolução de  $\approx 1\mu m$  sobre um campo máximo de visão de  $\approx 30mm^2$  é obtido. Para a plataforma holográfica em vídeo, protozoários, rotíferas, platelmintos, dentre outros micro-organismos podem ser observados, sugerindo uma resolução espacial na ordem de algumas unidades de  $\mu m$  a uma taxa máxima de amostragem de 65 *frames* por segundo.

A área da holografia digital *inline* é bastante recente, e aspectos de super-resolução

foram inicialmente publicados em meados de 2012. As principais diferenças da plataforma holográfica propostas nesta tese é em relação aos aspectos de hardware e aspectos computacionais para processamento das imagens. Especificamente para a plataforma com melhoramento de resolução, uma única fonte de iluminação é utilizada e deslocada sobre a base da plataforma. O registro das imagens é realizado pelo alinhamento rápido do conjunto de baixa-resolução utilizando métodos baseados em características, seguido pela otimização inspirada em equações de energia baseadas em modelos variacionais de energia funcional, previamente explorados em [23, 51, 52]. Através do conceito de imageamento em múltiplos frames, a abordagem proposta foi validada utilizando células humanas reprodutoras masculinas [53]. Os métodos numéricos de difração escalar utilizados nesta abordagem possuem a sua fundamentação similar ao processo de decomposição de onda apresentados pelos Filtros de Gabor [54].

## 1.5 Estrutura da Tese

- Capítulo 1 - Introdução: descrição geral acerca do contexto inicial da holografia digital *inline*, bem como aspectos motivacionais que impulsionaram o desenvolvimento das plataformas propostas. Neste capítulo também é apresentado o objetivo geral e contribuições do trabalho.
- Capítulo 2 - Holografia Digital e Imageamento Sem-Lentes: neste capítulo os fundamentos gerais da holografia serão apresentados, juntamente com a teoria necessária para a compreensão dos aspectos da teoria de difração e os métodos para a reconstrução da informação holográfica. Neste capítulo é também apresentada a teoria originária de Gabor para a holografia, idealizada décadas atrás em seu artigo seminal, bem como aspectos do imageamento sem lentes e trabalhos correlatos descritos na literatura.
- Capítulo 3 - Plataforma Holográfia *Inline* Proposta: descreve a plataforma holográfica sem lentes para imageamento de amostras estáticas com foco em super-resolução, e a evolução para a plataforma em vídeo holográfico para a inspeção e

visualização *in-situ* de micro-organismos. Implementação prática dos métodos para difração escalar, baseada na convolução de Fresnel, é também descrita ao término deste capítulo.

- Capítulo 4 - Resultados Experimentais: os resultados experimentais obtidos pela plataforma holográfica proposta nos aspectos de super-resolução e processamento em vídeo serão descritos neste capítulo. A plataforma holográfica é então validada com amostras biológicas humanas de células reprodutoras masculinas, onde a confirmação microscópica é utilizada. Para a plataforma holográfica em vídeo, experimentos práticos são realizados com base em amostras de fluído, coletadas em ambientes residenciais.
- Capítulo 5 - Conclusão e Discussões: conclusões, discussões, considerações finais e trabalhos futuros serão apresentados ao término deste documento.

## CAPÍTULO 2

### HOLOGRAFIA DIGITAL E IMAGEAMENTO SEM-LENTE

Neste capítulo serão apresentados os conceitos gerais relacionados com a holografia digital e as plataformas de imageamento sem-lentes.

A holografia é uma área bastante ampla, e pode ser categorizada em diversas classes e áreas de aplicação. A holografia de uma forma geral pode ser vista como uma fotografia tridimensional, que é obtida sem o uso de lentes e onde a informação topológica do objeto analisado é armazenada. Este processo consiste na utilização de um feixe de luz ou laser, o qual interage com um objeto a ser imageado, e suas propriedades tridimensionais são capturadas por um processo foto-sensível. Outro feixe luminoso com as mesmas propriedades de comprimento de onda é utilizado como feixe de referência, que interage com o feixe de objeto, produzindo padrões de interferência no meio foto-sensível. A imagem tridimensional é obtida quando o objeto é removido juntamente com o seu feixe, restando somente o feixe de referência iluminando o meio foto-sensível. O resultado é a visualização do objeto e suas características tridimensionais como se visualizado a partir de uma janela. Na holografia digital, ocorre a substituição dos procedimentos foto-químicos de armazenamento por um meio eletrônico, tal como um sensor de imageamento CCD ou CMOS. Para os hologramas obtidos, métodos computacionais de reconstrução podem ser utilizados para a recuperação da informação original do objeto, mas sem a interrupção dos feixes. A grande vantagem da holografia digital em relação à holografia tradicional, é a possibilidade de imageamento em 4D e em tempo real, a qual não é possível na holografia tradicional.

O princípio geral da holografia só é possível graças a teoria de propagação e difração de ondas. Os padrões de interferência produzidos quando um feixe de onda intercepta obstáculos é muito bem explicado pela teoria da difração escalar e o princípio de Huygens, descoberto em 1678. Este princípio postula que qualquer obstáculo encontrado pelas ondas

é uma fonte de ondas esféricas, onde as ondas são emanadas igualmente para todas as direções. Surge então o princípio da difração, que posteriormente ao longo dos anos foi aprimorado por notáveis cientistas tais como Fresnel, que postulou os principais aspectos da difração de ondas. Aspectos de propagação de onda ou frentes de onda são essenciais para a holografia, onde efeitos oscilatórios produzidos pela mudança de amplitude da onda, denominados de *wavelets*, possibilitam caracterizar as propriedades topológicas de um objeto em padrões de interferência.

A partir da holografia tradicional e com os recentes avanços obtidos na tecnologia de sensores de imageamento, surge a holografia *inline*. Embora a holografia *inline* foi o entendimento mais simples da holografia desenvolvida por Gabor, este conceito só se tornou prático nos últimos anos. A holografia *inline*, como o próprio nome sugere, consiste na projeção direta do feixe de luz sobre o objeto, com um sensor de imageamento posicionado diretamente atrás do objeto. Esta modalidade de holografia apresenta uma série de vantagens sobre a holografia tradicional, tal como a estabilidade, fácil implementação, e miniaturização. É caracterizada principalmente para utilização de somente um feixe, que é utilizado como feixe de referência e objeto sem separação do sinal, diferentemente como realizado na holografia tradicional. No entanto, por ser *inline*, apresenta limitações quanto ao tratamento das imagens virtuais e reais, que são projetadas no mesmo plano, ocasionando resíduos quando decodificadas por métodos numéricos.

A holografia *inline* não deixa de ser uma abordagem de imageamento sem lentes. Plataformas de imageamento sem-lentes baseadas em holografia ou em somente assinaturas espaciais, tem se tornado bastante atrativas para o desenvolvimento de aplicações portáteis e miniaturizadas. Tecnologias de imageamento vem sendo aprimoradas e demandadas a cada dia pela indústria dos portáteis, trazendo uma grande perspectiva de constante melhoramento nas tecnologias de detectores de imagem. Surge então uma nova área de aplicação, ditada principalmente pelo imageamento biológico microscópico, onde plataformas de POC vem sendo desenvolvidas. Não obstante, os avanços computacionais também estão possibilitando a aplicação de muitas técnicas de análise inteligente de imagens, anteriormente restritas pelas limitações computacionais, e hoje é possível o desenvolvimento



de computação completamente embarcada às plataformas de imageamento, provendo análise automatizada e em tempo-real. Todos estes avanços computacionais e tecnológicos estão possibilitando o desenvolvimento de poderosos sistemas portáteis de microscopia, em alternativa aos custosos microscópios ópticos.

## 2.1 Fundamentos da Holografia

### 2.1.1 Contextualização

Holografia foi inventada em 1947 por Denis Gabor como um esforço para melhorar a resolução dos microscópios ópticos existentes [2]. Surgiu basicamente da necessidade de correção das aberrações esféricas produzidas pelas lentes dos microscópios convencionais, as quais eram complexas de serem resolvidas à medida que a ampliação da imagem era realizada. Mesmo com certas correções, microscópios baseados em lentes dependiam muito da qualidade dos componentes ópticos e da metodologia para fabricar tais componentes. Não obstante, o limite de difração era imposto como última barreira das leis físicas, restringindo a habilidade de instrumentos ópticos de distinguir entre objetos separados por uma distância lateral menor que aproximadamente metade do comprimento da luz, utilizada para iluminar a amostra. Mesmo com a utilização de sistemas de iluminação de altas frequências do espectro de luz, um limite de aproximadamente 100 nanômetros nunca poderia ser ultrapassado por meios ópticos.

Na Figura 2.1 o princípio básico de um microscópio convencional baseado em lentes é apresentado. De maneira similar aos princípios utilizados na fotografia, a imagem é formada com base em variações de intensidades capturadas e armazenadas em um meio físico através de uma placa foto-sensitiva ou digital. Uma fonte de luz (*source*) é utilizada para iluminar um objeto de interesse, de modo que ocorra a projeção do sinal no meio físico de armazenamento. Espelhos são utilizados para direcionar o sinal e também para possibilitar que o objeto seja imageado em posição horizontal, e lentes são utilizadas para magnificação do sinal projetado. A imagem resultante é representada somente por contrastes e intensidades, e mensurações em planos verticais ou mesmo 3D não são possíveis

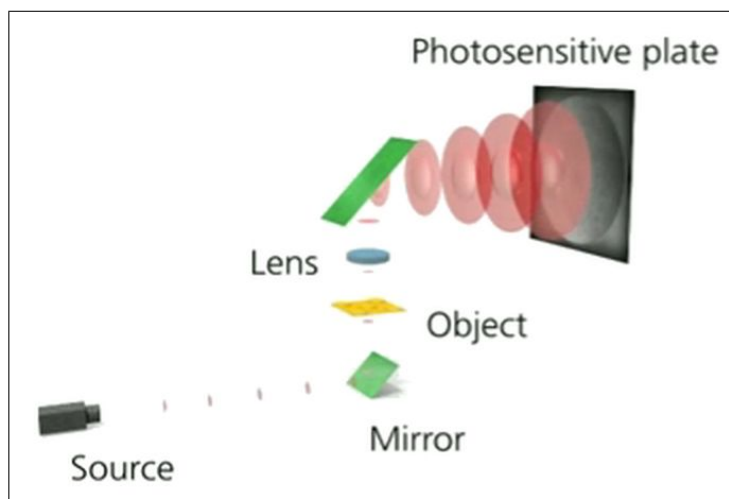


Figura 2.1: Configuração padrão encontrada em um microscópio convencional (adaptado de *LynceeTec* – [www.lynceetec.com/](http://www.lynceetec.com/)).

nesse sistema de imageamento.

Gabor trabalhava na empresa British Thomson Houston desenvolvendo e aprimorando microscópios, quando compreendeu que a difração de padrões em um feixe de elétrons gerada pela interferência de um objeto representava de certa forma a informação completa da amplitude e a fase deste mesmo objeto. Desta forma, o armazenamento desta difração de onda poderia ser tipicamente utilizada para sintetizar o campo do objeto. Com estas descobertas, o microscópio de elétrons foi desenvolvido, superando significativamente a resolução dos microscópios ópticos convencionais. Como o comprimento de onda de um elétron é algumas dezenas de mil vezes menor que o comprimento de onda de um fóton de luz [1], um microscópio de elétron possui poder de resolução significativamente maior que microscópios ópticos, que são limitados pela barreira da difração da luz. A técnica originalmente inventada, denominada de holografia de elétrons, é a mesma utilizada atualmente nos microscópios que utilizam o conceito de feixe de elétrons.

Na ilustração da Figura 2.2-(a) o princípio de um microscópio holográfico é demonstrado. Embora a ideia original de Gabor remete-se à holografia digital *inline*, descrita nas próximas subseções, o microscópio holográfico possui a mesma base conceitual do microscópio de elétrons inicialmente inventando. Utilizando um único feixe de elétrons, um divisor de sinal é utilizado para separar o feixe original em outros 2 feixes: um para iluminação do próprio objeto, e outro para fornecer um feixe de referência, que será

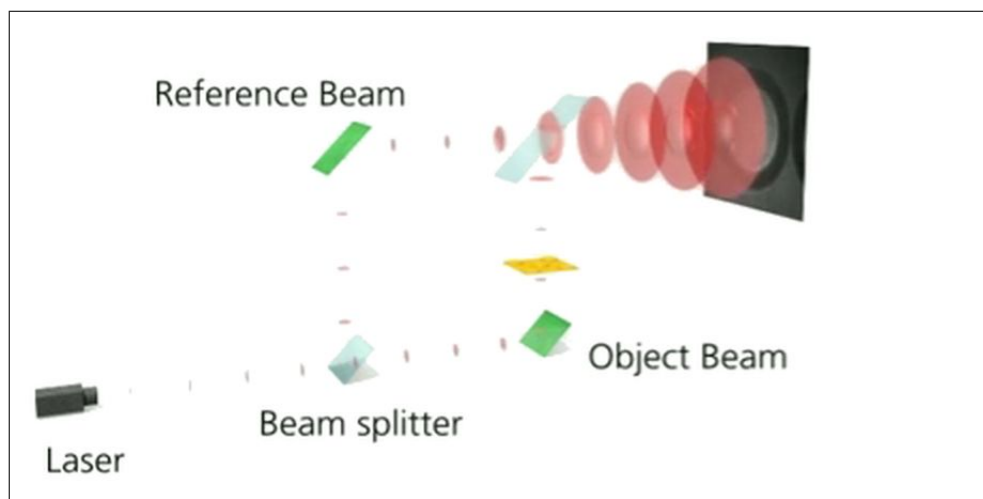
recombinado com o feixe do objeto. Pela recombinação de ambos os feixes, padrões de interferência na fase do feixe são gerados, e as interferências, denominadas de hologramas<sup>1</sup> são armazenadas fisicamente. Em seguida, o objeto anteriormente imageado é removido juntamente com o feixe do objeto, conforme ilustração da Figura 2.2-(b), restando somente o feixe de referência iluminando a placa foto-sensível contendo o holograma. O resultado é a recuperação de uma réplica original do objeto, codificada nos padrões de interferência. Se o holograma foi criado com sucesso, o observador será capaz de visualizar uma imagem idêntica ao objeto original – uma imagem muito semelhante a uma cena que alguém estaria visualizando em um espelho ou janela, com as mesmas percepções de profundidade de foco e propriedades tridimensionais. Gabor possibilitou não apenas capturar as intensidades do objeto original, como em um microscópio convencional, mas também a informação da fase, reconstruindo a imagem em uma representação completa em terceira dimensão. Diferentemente de uma fotografia digital, embora a imagem do holograma ser bi-dimensional, um holograma é verdadeiramente uma imagem 3D com real profundidade espacial.

O trabalho desenvolvido por Gabor foi de suma importância, encaixando-se como um novo paradigma de visualização de estruturas microscópicas, e recebendo o prêmio Nobel mais tarde em 1971 pela sua descoberta. Seu artigo seminal foi publicado em 1948 na revista *Nature*, possibilitando aos demais pesquisadores da área o aprimoramento das técnicas de holografia. Desta forma, Gabor propôs uma nova forma de visualização em escala microscópica, verificando que o conceito poderia ser tanto aplicado em microscópios de elétrons, como de luz monocromática desenvolvido anos depois. Este princípio então foi chamado de holografia, e possui como principal diferencial a habilidade de armazenar todas as características do campo óptico [1].

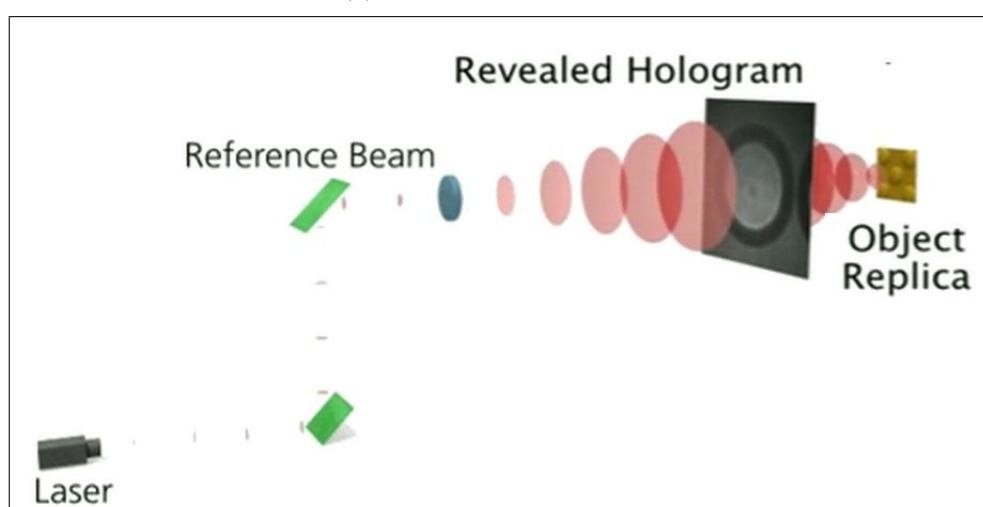
Embora a holografia tenha sido desenvolvida anteriormente aos avanços da iluminação coerente, em meados 1960, com a descoberta do laser, o feixe de elétrons foi substituído pela luz monocromática. Na mesma época, outros avanços significativos na holografia foram obtidos através de recursos computacionais, onde Goodman, em 1967, demons-

---

<sup>1</sup>Do grego *holos* (inteiro, todo) e *grama* (mensagem).



(a) Microscópio Holográfico



(b) Recuperação do Objeto

Figura 2.2: Configuração padrão de um microscópio holográfico em (a). Pela ausência do feixe do objeto, a réplica do mesmo objeto é obtida em (b) (adaptado de *LynceeTec* – [www.lynceetec.com/](http://www.lynceetec.com/)).

trou a holografia em meio eletrônico [20]. Uma câmera digital foi utilizada como meio eletrônico de armazenamento, e um computador foi utilizado para reconstruir imagens com uma boa qualidade de resolução. Goodman demonstrou a viabilidade de reconstruir imagens holográficas através de cálculos numéricos, trabalhando com a reconstrução digital de hologramas pelo princípio de Gabor. A propagação dos campos ópticos pode ser completamente descrita pela teoria da difração com bastante precisão, o que permite a reconstrução numérica da imagem como representação de números complexos da fase e da amplitude do campo óptico. Uma grande vantagem da holografia digital além de possibilitar o imageamento 4D em tempo real, é que a partir de um simples holograma é

possível focar numericamente a imagem a qualquer distância [28]. Do holograma digitalizado, é possível analisar a informação espaço-tempo da amostra imageada quantas vezes forem necessárias, como se o volume original ainda estivesse presente. Surge desta forma a holografia digital, onde o padrão de interferência holográfico é gerado opticamente pela superposição do feixe do objeto e do feixe de referência, digitalmente amostrados por um sensor de imageamento, e sem a necessidade de remover o feixe do objeto.

Em meados da década de 90 houve uma melhora significativa nos sensores de captura de imagens. Embora ainda não apresentassem uma alta densidade de *pixels*, já vinham sendo utilizados para aplicação do imageamento por sombra, de modo que assinaturas espaciais eram capturadas sob certas restrições de resolução. Um dos trabalhos pioneiros onde um setup holográfico utilizando um sensor CCD conectado a um computador como entrada foi proposto em 1994 [55]. Em 1996, a tomografia microscópica óptica foi proposta utilizando um sistema de iluminação de baixa coerência e um sensor CCD com  $512 \times 768$  *pixels* [56]. Neste trabalho uma resolução de  $30\mu m$  foi obtida utilizando métodos numéricos para a reconstrução de imagens holográficas. Tipicamente sensores CCD foram inicialmente utilizados para tal finalidade, e mais recentemente sensores por CMOS foram e continuam sendo utilizados para capturar e digitalizar um padrão de interferência holográfico [28]. O *pixel-size* destes dispositivos é na ordem de alguns micrômetros, e estes parâmetros são atualmente os maiores fatores limitantes na resolução da holografia digital. Na holografia, quanto maior a qualidade e quantidade das franjas nas ondas, melhor é o resultado obtido pela reconstrução numérica, logo o tamanho do *pixel-size* é de fundamental importância na holografia digital. Em meados de 2000, com a expressiva melhora nos sensores CCD e re-invenção dos sensores CMOS, uma série de empresas com foco em imageamento holográfico acabaram emergindo.

A holografia nos dias atuais pode ser considerada bem desenvolvida. Na holografia tradicional ou digital, a holografia segundo Gabor é compreendida de dois passos: (i) obtenção do holograma, e (ii) reconstrução ou decodificação por inversão do caminho percorrido pela luz, fisicamente ou numericamente. Foi também compreendido que o uso de estruturas não planares no feixe de referência tem direcionado a várias manipulações

na saída holográfica, como por exemplo, a magnificação do sinal. A holografia também possui aplicações não somente na microscopia, mas também na holografia de propósito geral, denominada de holografia tradicional.

### 2.1.2 Teoria da Difração

Difração é um dos efeitos produzidos quando uma onda ou feixe de luz intercepta objetos ao longo do seu caminho. Na representação<sup>2</sup> da Figura 2.3, uma onda qualquer ao colidir com uma partícula, tende a produzir efeitos distintos sendo principalmente categorizados em quatro tipos: reflexão, refração, absorção e difração. Uma parcela das ondas tendem a refletir de acordo com ângulo de entrada ao atingir a superfície do objeto, e algumas destas ondas são repelidas para o sentido oposto. Outras ondas, devido a transparência e opacidade do objeto podem apresentar a refração com seu ângulo de saída alterado, dependendo das propriedades ópticas e o índice de refração das partículas. No caso da refração, a luz pode ainda apresentar aspectos distintos de acordo com o tamanho das partículas: pode ser absorvida para as partículas opacas, e re-radiadas para diferentes direções e/ou apresentarem menos significância no caso de partículas maiores. Outro efeito bastante importante obtido pela colisão de ondas ou feixes em partículas é o efeito da difração. A difração ocorre principalmente quando a onda colide com as laterais do objeto, produzindo uma pequena variação do seu ângulo de saída. De maneira similar ao efeito da reflexão, a difração ocorre nas superfícies de uma partícula, sendo particularmente útil para capturar a informação de topologia do objeto interceptado pelo efeito de dobramento da luz.

No campo da óptica, a difração é utilizada em diversas aplicações, pois leva em consideração propriedades geométricas dos objetos codificados em padrões de interferência. Difração pode ser descrita ainda como as várias divergências que são encontradas no comportamento da luz quando obstáculos são encontrados, e similarmente na física clássica, como a flexão aparente da onda entorno de pequenos obstáculos. Especialmente para o caso de pequenas aberturas cujo diâmetros são na ordem do comprimento de onda da luz,

---

<sup>2</sup>Adaptado de <http://www.horiba.com>

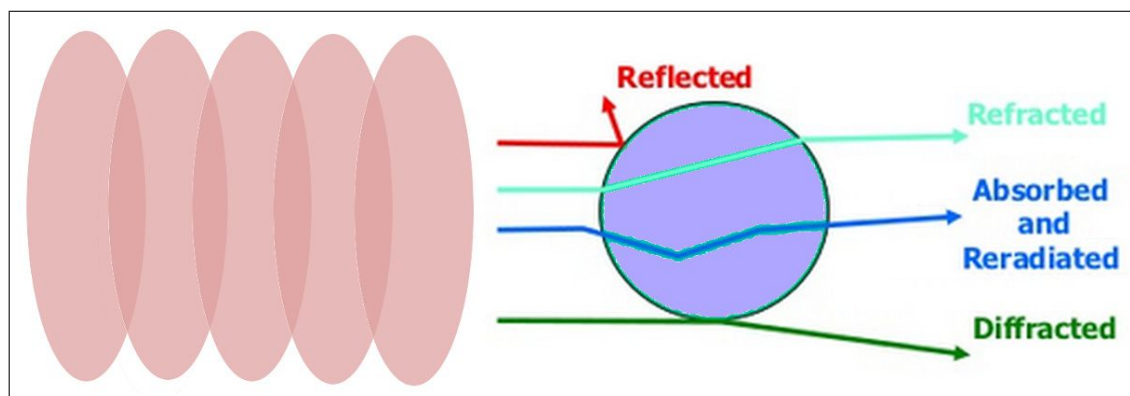


Figura 2.3: Feixe de luz interceptando uma partícula, onde quatro efeitos podem ser verificados: difração, refração, reflexão e absorção.

a difração atua com o efeito de dobramento da onda. Isso ocorre porque o impacto da onda no obstáculo produz uma distorção na frente da onda, e o formato do obstáculo irá proporcionar características distintas na propagação da luz. Para exemplificar, a onda ao atingir aberturas em formatos circulares tende a produzir efeitos de interferência diferentes dos produzidos quando uma abertura retangular é utilizada, uma vez que os caminhos percorridos pelos feixes serão distintos para ambas as formas geométricas.

O efeito da difração pode ser percebido na natureza, e ocorre praticamente com todos os tipos de ondas incluindo ondas sônicas, aquáticas, e eletromagnéticas assim como radio, raios-X e a luz visível. O princípio da difração possui relação com as propriedades de transporte de energia realizada pelas ondas de um ponto a outro no espaço, possuindo similaridade com o princípio da interferência. O formalismo da difração também pode descrever a forma com que as ondas de extensão finita propagam-se em um espaço livre de obstáculos. Efeitos similares de propagação de luz ocorrem quando uma onda viaja através de um meio, cujo índice de refração é variado conforme visto anteriormente, ou mesmo quando uma onda sonora encontra um meio com variada impedância acústica.

A propagação de ondas pode ser descrita através do princípio de Huygens-Fresnel, especificamente desenvolvido para o problema de propagação de ondas tanto para difração em campo-curto quanto longas distâncias. O princípio de Huygens-Fresnel fornece uma boa base de entendimento e predição do efeito de propagação de ondas de luz. O princípio, inicialmente descoberto por Huygens em 1678, é baseado na ideia de que cada ponto

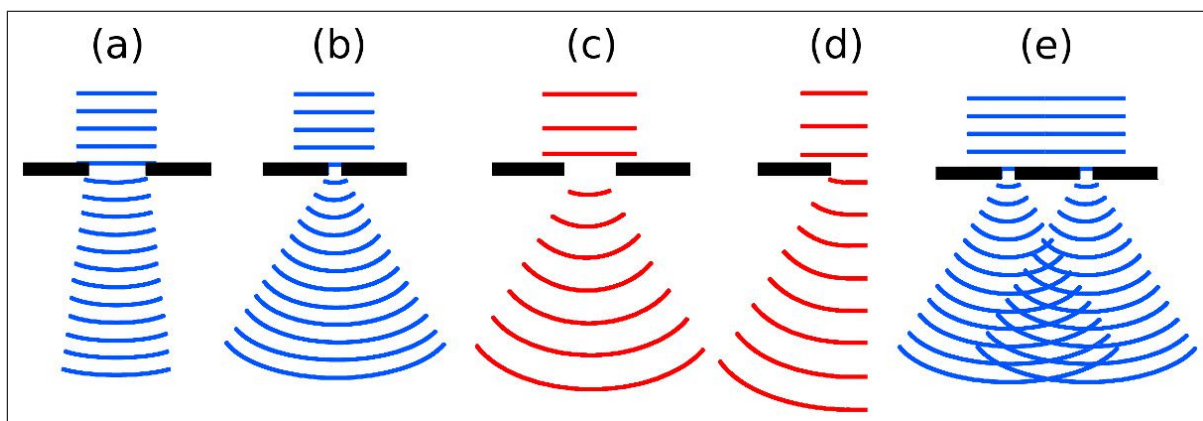


Figura 2.4: Mudanças de comportamento para ondas planares quando aberturas ou obstáculos são encontrados. Em (a)–(b) ondas de menor comprimento são utilizadas em relação às ondas de maior comprimento demonstradas em (c)–(d). Em (e) caso particular para múltiplas aberturas numéricas e efeito produzido pela interferência da luz.

encontrado gera um distúrbio luminoso, que torna-se fonte de uma nova onda esférica. Estes pontos podem ser encontrados em cada frente de onda, e estes pontos irão propagar em todas as direções gerando ondas secundárias de maneira rectilinear. Através disto é possível verificar que frentes de ondas são criadas a partir de interferências entre novas ondas, geradas a partir de frentes de ondas criadas em um momento anterior. A soma das ondas secundárias também determina a forma da onda em qualquer tempo subsequente. Huygens assumiu que as ondas secundárias avançavam apenas em uma única direção, formando a base da propagação de ondas planares (lineares) e esféricas. Em 1816, Fresnel demonstrou um novo princípio, que combinado com o princípio original de Huygens explica o princípio da difração e como a propagação rectilinear ocorria com a colisão em objetos.

Os diferentes efeitos da propagação de ondas ou feixes de luz propostos por Huygens-Fresnel podem ser verificados através da Figura 2.4. Neste exemplo, frentes de ondas planares com comprimento de onda  $\lambda$  distintos são disparadas contra obstáculos ou aberturas numéricas. Em (a) e (b) feixes com o mesmo comprimento de onda foram utilizados em aberturas numéricas de diferentes tamanhos, onde é possível verificar a influência da abertura em relação à onda produzida na saída. Aberturas numéricas de tamanho relativamente maiores que o próprio comprimento da onda tendem a apresentar pouca influência no padrão da onda produzida na saída da abertura, conforme ilustrado em (a). Embora as ondas tenham sofrido alguma alteração de ângulo, ainda continuam proxima-



mente planares especialmente no seu centro de propagação, tal como sua onda de origem. Quando aberturas numéricas com diâmetros próximos do comprimento da própria onda são utilizadas, as ondas tendem a sofrerem mais pelo efeito de dobramento da luz, produzindo ondas esféricas na saída da abertura conforme demonstrado em (b). Ondas de maior comprimento são demonstradas na Figura 2.4 em (c) e (d). Em (c) uma abertura numérica de tamanho similar à demonstrada anteriormente em (a) é apresentada. Devido ao comprimento maior da onda, o efeito de dobramento é possível de ser obtido nesta abertura numérica, diferentemente quando ondas de menor comprimento são utilizadas. Em (d), um outro efeito bastante distinto é verificado pela representação de um obstáculo e uma onda planar que o intercepta. Neste exemplo, diferentemente de uma abertura numérica, a onda sofre efeito de dobramento somente no lado onde ocorre a interceptação com a superfície. Isto demonstra a capacidade das ondas em produzirem diferentes efeitos quando obstáculos são encontrados, e mantendo seu comportamento de propagação normal quando livre destes. Outro efeito particular é demonstrado em (e), quando a onda encontra duas aberturas numéricas espaçadas entre si.

Similarmente ao exemplo demonstrado na Figura 2.4-(b), ondas planares são convertidas em ondas esféricas, cada qual com seu ponto de origem, de maneira que ao colidirem entre si na saída das aberturas, efeitos complexos de dobramento são produzidos pela super-posição e colisão das ondas vindas de diferentes direções. A partir desta característica de propagação, as *wavelets* podem ser combinadas, deslocadas, multiplicadas e integradas, e conhecendo o seu comportamento, diferentes frentes de onda podem ser recriadas. De uma maneira geral, efeitos de difração são mais sensíveis para maiores comprimentos de onda, e/ou quando aberturas numéricas bastante reduzidas são utilizadas. No entanto, o princípio de Huygens pode ser visto como uma consequência de um meio de propagação isotrópico, de modo que todas as direções são de igual importância, e qualquer distúrbio criado em uma suficientemente pequena região neste espaço, irá propagar a partir deste ponto para todas as direções de forma radial. Por sua vez, ondas criadas a partir do distúrbio também serão propagadas para outras regiões, apresentando super-posição com demais ondas produzindo complexos padrões de interferência.

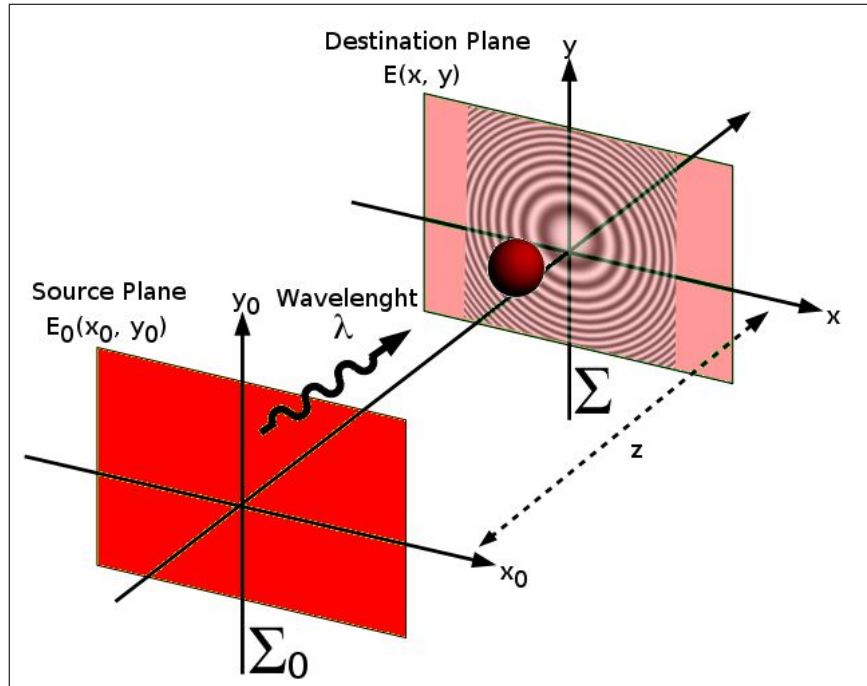


Figura 2.5: Difração de uma onda monocromática com comprimento de onda  $\lambda$  a partir do plano de entrada  $\Sigma_0$  e o plano de destino  $\Sigma$ . Ao longo de  $z$ , a onda intercepta uma partícula esférica, projetando interferências no plano de destino.

Na Figura 2.5 o processo de difração realizado com ondas planares ou esféricas partindo do plano  $\Sigma_0$  em direção a  $\Sigma$  é ilustrado. A distância entre ambos os planos é representado por  $z$ , e  $\lambda$  corresponde ao comprimento da onda utilizada. Ao longo de  $z$  uma partícula esférica é encontrada, produzindo através da difração os padrões de interferência projetados no plano  $\Sigma$ .

Para o contexto da holografia, a capacidade de discriminação da superfície de uma partícula torna o efeito de difração particularmente único. Idealmente, a difração da luz deve ocorrer somente a partir de um único ponto, tal como demonstrado na figura anterior, embora haja pesquisas onde pontos de diferentes fontes são utilizadas para obter resultados diversificados. Esta aplicação é possível porque a propagação de ondas resulta em um conjunto de frentes de onda, que quando interceptadas por objetos produzem uma memória holográfica correspondente às interferências dos padrões das topologias analisadas. Estas interferências podem ser analisadas reversamente com a utilização de métodos numéricos de difração, possibilitando a recuperação da forma original do objeto.

O fenômeno de difração também ocorre em nível atômico, uma vez que a difração

também ocorre na matéria e pode ser verificada através dos princípios da mecânica quântica. A resolução de um microscópio óptico é de certa forma limitada pela difração, uma vez que além do limite de difração o microscópio não consegue manipular adequadamente a luz. A partir deste ponto de vista, claramente a difração e os aspectos de resolução de microscópios ópticos são sempre proporcionais ao comprimento da luz utilizada. No entanto, microscópios de elétrons, conforme apresentado anteriormente por Denis Gabor, conseguem melhorar significativamente a resolução no processo de aquisição pelo princípio da dualidade partícula-onda<sup>3</sup>. Este princípio postula que cada partícula possui um comprimento de onda equivalente, fazendo com que estas apresentem as propriedades de ondas. Isto é possível devido ao fato de o comprimento de onda dos elétrons ser dezenas de milhares de vezes menor do que o comprimento de onda da luz visível [1]. Com isto, resolução em nano escala é obtida, uma vez que é possível focar o feixe de elétrons muito mais precisamente que um feixe de luz.

### 2.1.3 Métodos de Difração Escalar

Cálculo de difração é o processo de encontrar soluções computacionais para o problema da fase produzido pelo efeito aparente de dobramento de uma onda de luz quando obstáculos e aberturas numéricas são interceptadas. A teoria da propagação e difração de campos eletromagnéticos possui uma longa história de desenvolvimento, e seus cálculos são utilizados em uma ampla gama de aplicações da óptica tais como geração computacional de hologramas, holografia digital, microscopia, codificação e decodificação em imagens, análise tridimensional em dispositivos ópticos, dentre outras [57]. De maneira superficial, uma abordagem prática para a teoria da difração escalar é utilizar por base a difração de Fresnel, que é conhecida pela sua precisão em uma variada janela de configurações. Precursores da holografia digital utilizaram a óptica de Fourier e então uma simples transformada pode ser utilizada para realizar a reconstrução dos padrões de interferência holográficos [28].

---

<sup>3</sup>Dualidade partícula-onda propõe que cada partícula elementar exhibe suas próprias propriedades de ondas.

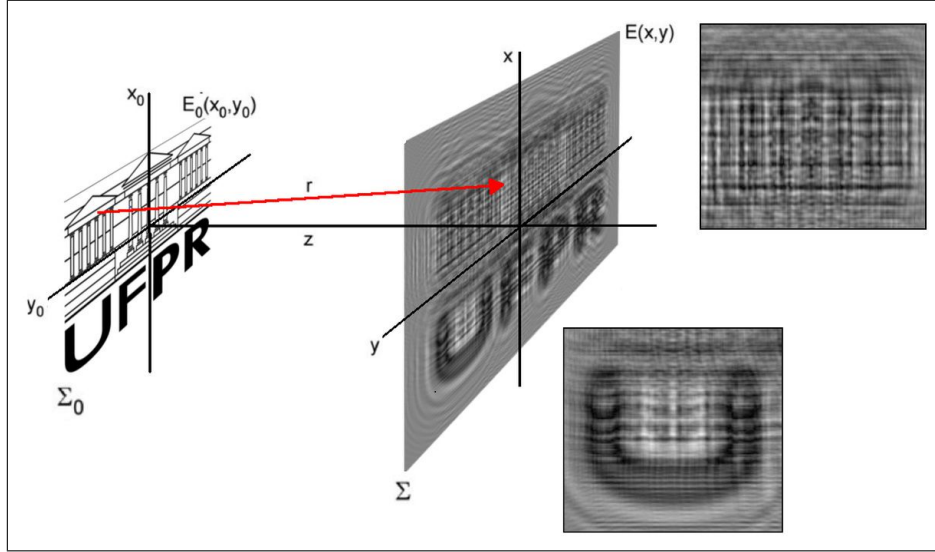


Figura 2.6: Difração do logo UFPR que está localizado no plano de entrada  $\Sigma_0$  e projeção das interferências no plano de destino  $\Sigma$  localizado a uma distância  $z$ .

Existem diferentes métodos especificamente desenvolvidos para calcular numericamente a difração de um campo. Na óptica de Fourier, cálculos de difração podem ser categorizados em difração baseada em convolução ou baseada na transformada de Fourier, entre um plano de abertura  $\Sigma_0$  e o plano de destino  $\Sigma$ , conforme representado anteriormente pela Figura 2.5, onde padrões de interferências esféricas foram produzidos. Um exemplo mais complexo de difração é demonstrado através da Figura 2.6, produzido computacionalmente pela difração de Fresnel descrita mais adiante. Ondas interceptam o padrão UFPR produzindo os efeitos de difração sobre o plano  $\Sigma$ , que está localizado a uma distância  $z$ . Como pode ser verificado através das áreas em destaque, a entrada do feixe de luz no padrão produz sinais de interferências que dependem do tamanho e forma do objeto interceptado. Na área em destaque no canto superior direito, os padrões do objeto apresentam menor largura em relação ao correspondente da letra  $U$ , onde diferentes formas de difração podem ser observadas conforme a propagação do feixe ocorre.

A reconstrução do sinal a partir dos padrões de interferência ocorre através da retropropagação, com o processo reverso percorrido pelo feixe luminoso. Este processo requer a análise dos padrões de interferência por meio da matemática discreta [58], e em geral a transformada discreta de Fourier (DFT) pode ser eficientemente utilizada para calcular a difração. As abordagens mais comuns para a reconstrução tem sido a convolução de Huy-

gens, também denominada de difração direta de Fresnel por convolução, a transformada de Fresnel por Fourier, e mais recentemente o Método do Espectro Angular (ASM). Os métodos anteriormente descritos são os mais utilizados devido ao fato de serem apropriados para reconstruções de distâncias curtas a longas.

### 2.1.3.1 Convolução de Fresnel (Huygens)

A difração pode ser formulada a partir da teoria da propagação de ondas esféricas proposta por Huygens. Através desta teoria, Fresnel propôs a fórmula para o problema geral da difração em uma abertura bi-dimensional. Considere a difração a partir de uma abertura numérica em sentido a um campo de entrada  $E_0(x_0, y_0)$  do plano  $\Sigma_0$  ( $z = 0$ ), de modo que as interferências são propagadas até o campo de saída  $E(x, y, z)$  do plano  $\Sigma$ , separados a uma distância  $z$  conforme ilustrado pela Figura 2.6. A equação que define a difração de ondas pode ser definida por [59]:

$$E(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi} \iint_{\Sigma_0} dx_0 dy_0 E_0(x_0, y_0) \frac{\exp(ikr)}{r}, \quad (2.1)$$

a qual é equivalente a [28]

$$E(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi z} \iint_{\Sigma_0} dx_0 dy_0 E_0(x_0, y_0) \exp \left[ ik \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + z^2} \right]. \quad (2.2)$$

O comprimento da onda é definido por  $k = 2\pi/\lambda$ , e  $r$  é a distância de um ponto em  $\Sigma_0$  e seu correspondente em  $\Sigma$ , deslocado por um fator de ângulo. A integral para a difração acima apresentada pode ser representada na forma de uma convolução  $E(z, y; z) = E_0 \odot S_H = F^{-1}\{F\{E_0\} \cdot F\{S_H\}\}$ , onde  $[\cdot]$  e  $F^{-1}$  denotam a convolução e a transformada inversa de Fourier, respectivamente.  $F\{E_0\}$  e  $F\{S_H\}$  são as transformadas de Fourier dos campo de entrada e na resposta do impulso, e  $S_H$  é a função PSF correspondendo a *wavelet* esférica de Huygens como sendo [59]:

$$S_H(x, y, z) = -\frac{ik}{2\pi z} \exp \left[ ik \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \right]. \quad (2.3)$$

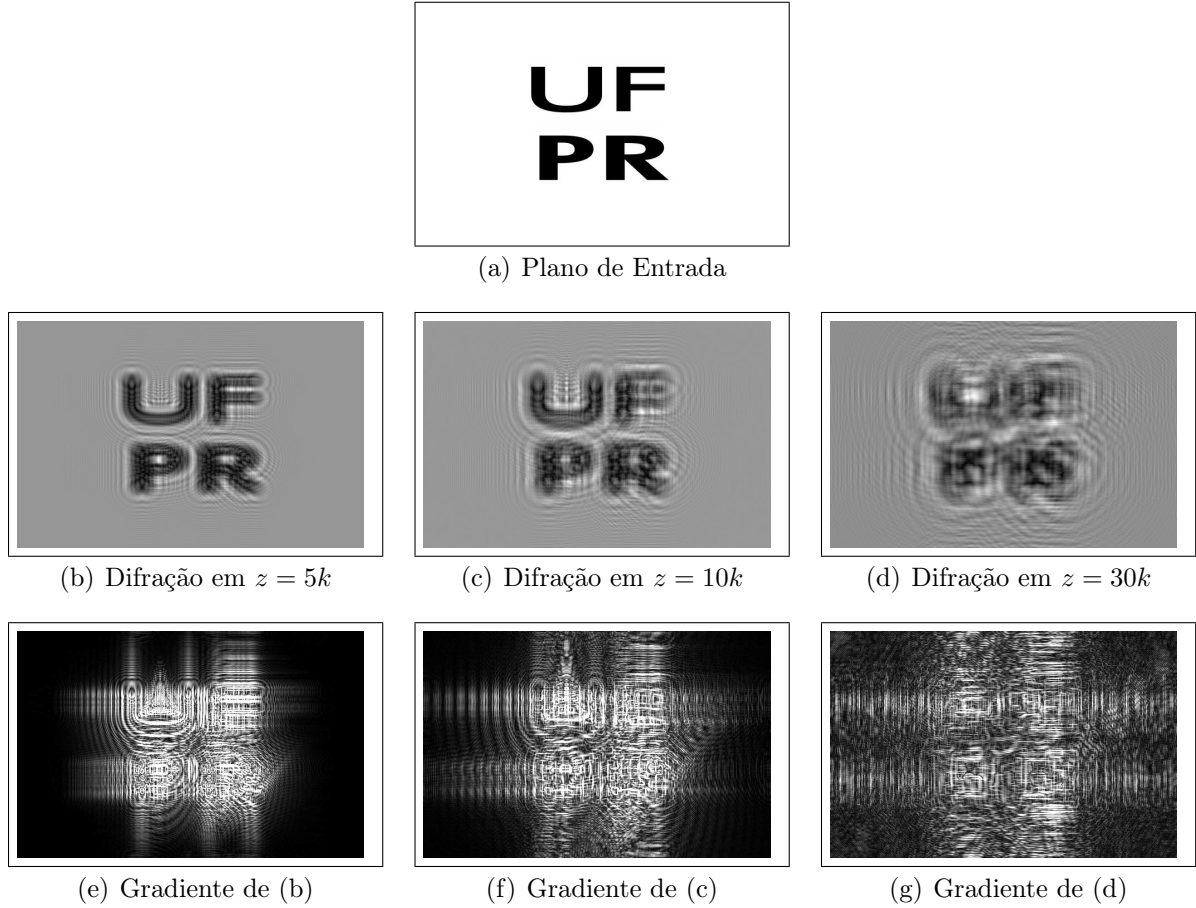


Figura 2.7: Difração pela convolução de Fresnel do plano de entrada em (a), considerando diferentes distâncias de planos.

Na forma discreta, a convolução de Fresnel pode ser solucionada pela utilização de três transformadas de Fourier, onde a imagem reconstruída possui as mesmas dimensões da imagem de holograma. Na Figura 2.7 o holograma computadorizado gerado através da difração de uma onda monocromática é representado pela convolução de Fresnel. Em (a) padrão de entrada no campo de entrada  $\Sigma_0$ . Em (b), (c) e (d) difração no campo de saída  $\Sigma$  computados a diferentes distâncias, sendo  $z = 5k, 10k, 30k$ , respectivamente. Em (e), (f) e (g), gradientes dos hologramas obtidos foram computados com o objetivo de melhor visualização do efeito da difração. Pode ser verificado a influência da distância  $z$  do plano de saída na geração dos hologramas e efeito de propagação da onda. Parâmetros utilizados para a geração dos hologramas foram  $\lambda = 385nm$ , com um *pixel-size* de  $1.67\mu m$ , e resolução da imagem de entrada de  $624 \times 408$  *pixels*.

### 2.1.3.2 Transformada de Fresnel

A transformada de Fresnel é o método mais amplamente utilizado e popular na holografia digital devido a sua eficiência computacional [60]. A transformada de Fresnel é utilizada para desenvolvimento teórico da difração [59], sendo mais difundida para realizar aproximações paraxiais. No entanto, para ondas esféricas a transformada de Fresnel é válida dentro de uma distância mínima  $z^3 \gg \frac{k}{8} [(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2]_{max}^2$ , e a função de espalhamento PSF de Fresnel é dada por:

$$S_F(x, y; z) = -\frac{ik}{2\pi z} \exp \left[ ikz + \frac{ik}{2z}(x^2 + y^2) \right]. \quad (2.4)$$

Com base no PSF de Fresnel, uma única transformada de Fourier pode ser utilizada para calcular a difração. Isto se deve ao fato da frente de onda ser esférica e ser aproximadamente parabólica [59], e o campo de difração pode ser expresso através de

$$F\{f(x, y)\}[k_x, k_y] = \frac{1}{2\pi} \iint dx dy f(x, y) \exp[-i(k_x x + k_y y)], \quad (2.5)$$

com  $k_x = k \frac{x}{z}$  e  $k_y = k \frac{y}{z}$  sendo frequências espaciais, e na sua forma discreta sendo composta por:

$$E(x, y; z) = 2\pi \exp \left[ \frac{ik}{2z}(x^2 + y^2) \right] F\{E_0(x_0, y_0) S_F(x_0, y_0; z)\}[k_x, k_y], \quad (2.6)$$

Numericamente, a transformada de Fresnel requer uma simples transformada de Fourier, sendo eficientemente implementada através da transformada rápida de Fourier (FFT) [28]. Conforme representação ilustrada na Figura 2.6,  $x_0$  e  $y_0$  é a área do campo de entrada  $E_0$ , a qual é amostrada em um array  $N_x$  por  $N_y$  com *pixel-size* correspondendo a  $\Delta x_0$  e  $\Delta y_0$ . O campo de saída é outro array com as mesmas dimensões do array de entrada com  $N_x$  por  $N_y$ , mas o *pixel-size*  $\Delta x$  e  $\Delta y$  da imagem reconstruída pode variar de acordo com a distância de reconstrução  $z$ .

### 2.1.3.3 Método do Espectro Angular

O método do Espectro Angular (ASM) é uma abordagem alternativa para descrever a difração pela decomposição plano-onda, sendo que é uma técnica utilizada para modelar a propagação através da expansão de uma onda complexa em somatórios finitos de planos de onda [57]. Dado o campo inicial  $E_0(x_0, y_0)$  localizado no plano de entrada  $\Sigma_0$ , o espectro angular pode ser definido pela seguinte transformada de Fourier de  $F\{E_0\}$  [59]:

$$A_0(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{\Sigma_0} dx_0 dy_0 E_0(x_0, y_0) \exp[-i(k_x x_0 + k_y y_0)], \quad (2.7)$$

o qual descreve a amplitude de vários componentes de plano-onda para um determinado padrão de entrada no campo inicial. Logo, o campo de entrada é a transformada inversa de Fourier do espectro angular na forma de:

$$E_0(x_0, y_0) = \frac{1}{2\pi} \iint_{\Sigma_0} dk_x dk_y A_0(k_x, k_y) \exp[i(k_x x_0 + k_y y_0)]. \quad (2.8)$$

Na Equação 2.8,  $k = (k_x, k_y, k_z)$  é definido como um vetor de onda, que é conjugado com um fator exponencial de fase descrito pela projeção de um plano de onda  $(x_0, y_0)$ . Sendo que  $k$  pode ser definido por  $k_z = \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$ , o campo de entrada  $E_0(x_0, y_0)$  pode ser visto como a projeção de diversos componentes de plano-onda propagando em várias direções  $k$ . Isto porque um holograma complexo e os campos de onda em  $\Sigma_0$  e  $\Sigma$  são considerados superposição dos planos de onda com os vetores de onda  $k$  [60]. Após a propagação sobre  $z$ , cada componente de plano-onda adquire um fator de fase  $\exp(ik_z z)$ , e a seguinte função PSF pode ser utilizada [59]:

$$S_A(x, y; z) = \frac{1}{2\pi} F^{-1} \left[ \exp \left( i \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} z \right) \right] [x, y]. \quad (2.9)$$

A partir da função  $S_A$ , a convolução pode ser computada a partir do plano de entrada  $E_0 \odot S_A$ , e o método do espectro angular pode ser obtido através de 2 transformadas de



Fourier segundo [59]:

$$E_A(x, y; z) = F^{-1} \left[ F\{E_0\}[k_x, k_y] \exp[i\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}z] \right] [x, y]. \quad (2.10)$$

O método do espectro angular é baseado em convolução, que utiliza a transformada de Fourier e a sua inversa em sequência, tal como realizado pelo método baseado na convolução de Huygens. Desta forma, ASM possui o mesmo limite de distância máxima em  $z$  mantendo o mesmo *pixel-size* para as imagens reconstruídas.

#### 2.1.3.4 Comparação dos Métodos de Difração Escalar

Embora alguns métodos apresentem resultados bastante similares entre si, algumas diferenças numéricas podem ser verificadas. Primeiramente, todos os métodos mencionados somente podem realizar reconstruções apenas em planos paralelos ao holograma [61], o que está inserido no contexto da holografia digital *inline*.

A transformada de Fresnel é válida para o caso paraxial através da propagação de ondas esféricas, e requerer uma aproximação parabólica da frente da onda para computar a difração. Como a onda não é planar, configurações mínimas e máximas de  $z$  são requeridas para que a onda atinja a superfície do sensor de imageamento integralmente, de modo que os hologramas gerados não sejam maiores do que a própria área do sensor.

No entanto, existe uma crescente demanda de maneiras de mensurar objetos com grandes aberturas numéricas ou causando altas ordens de difração devido aos objetos não estarem localizados na região paraxial [60]. A difração pela transformada de Fresnel utilizando uma única transformada de Fourier é válida para longas distâncias de  $z$  entre os planos  $\Sigma_0$  e  $\Sigma$ .

A convolução de Huygens pode ser resolvida por meio de três transformadas de Fourier, e é adequada para resolver a difração em distâncias curtas entre  $\Sigma_0$  e  $\Sigma$ , e é analiticamente bastante similar ao método do espectro angular.

Algumas particularidades e diferenças existentes nos métodos de difração descritos são resumidas pela Tabela 2.1, onde aspectos de distância de operação, tamanho do *pixel-size*

no plano  $\Sigma$  e memória requerida para execução são apresentadas. O método do espectro angular, também conhecido como método de expansão de plano-onda, é baseado na propagação planar de ondas, sendo que a amostragem das ondas nos *pixels* do sensor de imageamento são invariantes a distância mínima de  $z$ . Esta invariância faz com que o método ASM não apresente nenhuma limitação quanto a distância de operação, diferentemente da transformada de Fresnel e da convolução de Huygens [58]. Em termos de implementação, o método do espectro angular é um algoritmo baseado em convolução que usa as transformadas direta e inversa de Fourier sucessivamente, similarmente ao método de convolução de Huygens.

Tabela 2.1: Comparação dos métodos de difração.

Difração	Distância	<i>Pixel-size</i> $\Sigma$	FFT's	Memória
Convolução de Fresnel (Huygens)	Curta/Média	$\Delta x \Delta y$	3	2N x 2N
Transformada de Fresnel (Fourier)	Longa	$\frac{\Delta x}{\lambda z} \frac{\Delta y}{\lambda z}$	1	N x N
Método do Espectro Angular	Curta	$\Delta x \Delta y$	2	2N x 2N

Outra vantagem do método do Espectro Angular e mesmo da Convolução de Huygens diz respeito ao fato da operação realizada ser tipicamente uma convolução, o que faz com que a escala necessária na transformada rápida de Fourier se anule. Por fim, a frequência espacial do kernel de propagação do ASM é diretamente proporcional à distância de propagação [62]. Desta forma, quanto mais próximo um objeto estiver localizado do detector, mais precisa poderá ser a reconstrução com uma variação lenta do kernel de propagação. A difração pelo método do espectro angular pode ser resolvida por duas transformadas de Fourier, e é adequada para difrações em distâncias curtas entre os planos  $\Sigma_0$  e  $\Sigma$ .

#### 2.1.4 Relação com Wavelets do Filtro de Gabor

Filtro de Gabor é uma abordagem bastante interessante para a decomposição de um sinal em um conjunto de orientações e amplitudes de onda [54]. Foi desenvolvido em 1946, e apresenta relações diretas com o processamento dos sinais de interferências holográficas.

No contexto da holografia, pode ser utilizado para interpretação e classificação de um sinal holográfico, sem a necessidade de aplicação de difração numérica, e no processamento digital de imagens, o Filtro de Gabor é um dos descritores de informação de onda mais eficientes existentes na literatura, e pode ser utilizado para a extração de características em uma imagem. A decomposição do sinal é extraída da imagem a partir de um conjunto de funções base, as quais compõem o banco de filtros de Gabor (denominados de *Gabor filter bank*). Cada função base no *Gabor filter bank* é modulada por uma orientação e escala específicas, e um processo de convolução dos filtros com uma imagem produz respostas nas posições onde a estrutura local se adapta aos critérios do kernel analisado. Pela variação de escala e orientação, uma ampla variedade de filtros podem ser aplicados, de modo que diferentes sinais de onda podem ser extraídos de uma imagem.

Devido a sua simplicidade, esta abordagem tem se tornado bastante popular como um intuitivo *framework* para a extração e discriminação de texturas [63]. Filtros de Gabor ganharam rapidamente importância na comunidade científica, mais especificamente devido aos estudos na área de neurociência: os estudos das propriedades das ondas e suas conexões com a percepção humana tiveram início significativo com os trabalhos de John Daugman em 1985 [64], onde observou-se que as células existentes no córtex visual do cérebro de mamíferos podem ser modeladas a partir de funções de Gabor. Em meados de 1990, Perona e Malik [65] propuseram um modelo de percepção de frequências de onda para texturas, o qual é baseado nos estágios iniciais da percepção humana apresentados por Daugman. Este modelo de representação de texturas objetiva a decomposição de uma imagem de entrada em uma série de sinais com diferentes orientações e amplitudes. Etapas subsequentes deste processo são aplicadas para a discriminação das texturas em diferentes regiões, tal como não-linearidade e modelos de integração de energia. De uma forma geral, o modelo de Perona e Malik, baseado originalmente nos estudos de Gabor, pode ser obtido numericamente a partir de 3 estágios:

- (a) um banco de filtros simétricos lineares (*Gabor Filter bank*) é aplicado sobre uma imagem de entrada  $I$ , decompondo o sinal em uma série de respostas sensíveis à orientação e frequência. Em geral todos os filtros podem ser generalizados por uma

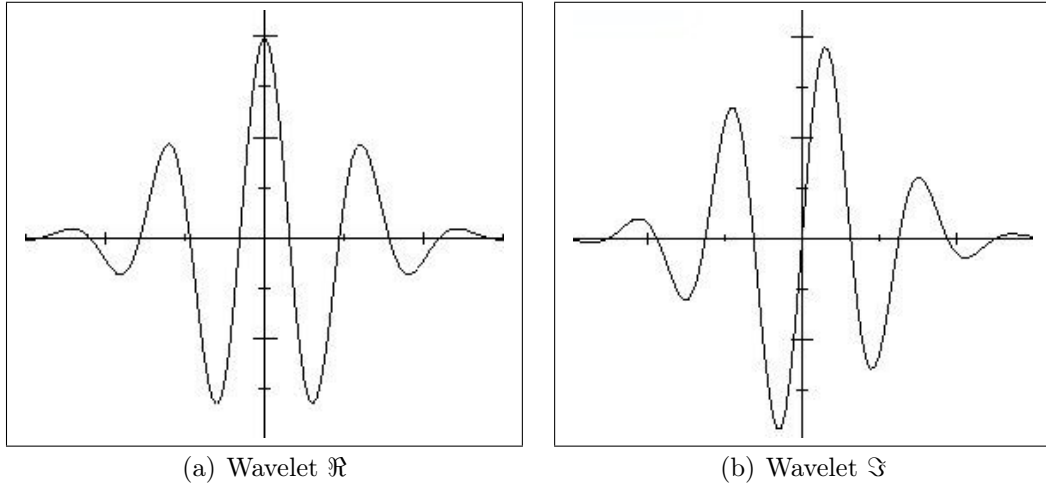


Figura 2.8: Partes reais e imaginárias de uma *Wavelet*.

única onda mãe com diferentes rotações e dilatações;

- (b) processo de não-linearidade para a supressão das respostas fracas em cada resposta do *Gabor filter bank*;
- (c) detecção da fronteira da onda e delimitação da região por meio de técnicas de integração da energia local (clusterização, filtro de Gaussiana, etc).

O primeiro estágio detalhado em (a) é conhecido por abordagem de filtragem em multi-canal (*multi-channel filtering approach*), o qual corresponde aos estágios primários da percepção humana [65]. Quanto a filtragem de frequências de onda em multi-canal, um dos trabalhos mais relevantes foi apresentado também por Jain [66], onde um algoritmo de representação de texturas para processamento de informação visual foi modelado. Neste trabalho, Jain observou a energia espectral das frequências de ondas através da decomposição por filtros de Gabor, uma vez que as texturas podem ser dependentes de escala. A abordagem de filtragem em multi-canal considera os canais como um banco de filtros de Gabor bi-dimensionais. Um *Gabor filter bank* consiste de um conjunto de filtros correspondendo a uma onda planar senoidal com frequências e orientações pré-determinadas, cada um modulado por uma função Gaussiana. No domínio de espaço, um filtro de Gabor é dado por:

$$h(x, y) = \exp \left\{ -\frac{1}{2} \left[ \frac{x^2}{\sigma_x^2} + \frac{y^2}{\sigma_y^2} \right] \right\} \cos(2\pi u_0 x + \phi). \quad (2.11)$$

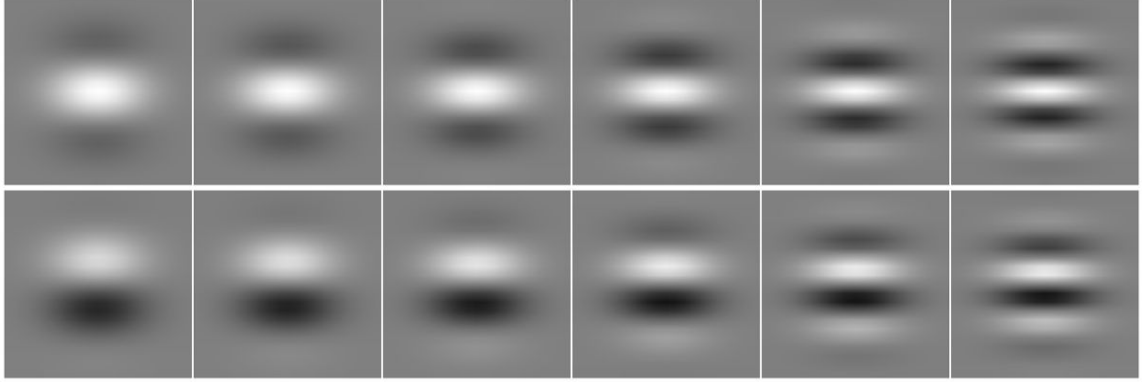


Figura 2.9:  $\phi = 0$  (cima –  $\Re$ ) e  $\phi = \pi/2$  (baixo –  $\Im$ ) para diferentes faixas de  $\sigma$ .

onde  $u_0$  e  $\phi$  correspondem respectivamente a frequência, e o *off-set* da fase (em graus) da onda planar senoidal ao longo da axis  $x$  (orientação  $0^\circ$ ). Se  $\phi = 0$  a parte real ( $\Re$ ) do filtro de Gabor é obtida apresentando a propriedade de simetria (*even-symmetric*), e  $\phi = \pi/2$  retorna a parte imaginária ( $\Im$ ). O desvio padrão  $\sigma$  determina o tamanho linear do respectivo campo Gaussiano ao longo das axis  $x$  e  $y$ . Na Figura 2.9 os efeitos dos parâmetros  $\phi$  e  $\sigma$  podem ser verificados.

Diferentes orientações podem ser obtidas por meio de uma rotação rígida do sistema de coordenadas  $x$ - $y$  com um valor de ângulo pré-definido por  $\theta$ , conforme segue:

$$x = x_0 \cos(\theta) + y_0 \sin(\theta), y = y_0 \cos(\theta) - x_0 \sin(\theta). \quad (2.12)$$

Tipicamente, um *Gabor Filter Bank* é composto de 4 diferentes orientações e 3 diferentes escalas, sendo  $\phi \in \{0, \frac{\pi}{4}, \frac{\pi}{2}, \frac{3\pi}{4}\}$  e  $\sigma$  variando de acordo com o tamanho do domínio da imagem. Entretanto, as decomposições podem também ser definidas arbitrariamente, tal como no exemplo da Figura 2.10, onde o *Gabor filter bank* foi produzido através de seis orientações distintas, a cada  $\phi = 30^\circ$  para faixas de escala. O objetivo principal desta representação é observar as propriedades de cobertura e extração das características de onda ao longo de diferentes configurações da onda senoidal.

Com o objetivo de determinar uma melhor configuração para o *Gabor filter bank*, Jain propôs o uso de um conjunto de filtros que é obtido de acordo com a dimensão da imagem (número de colunas) objetivando desta forma cobrir a imagem de entrada quase

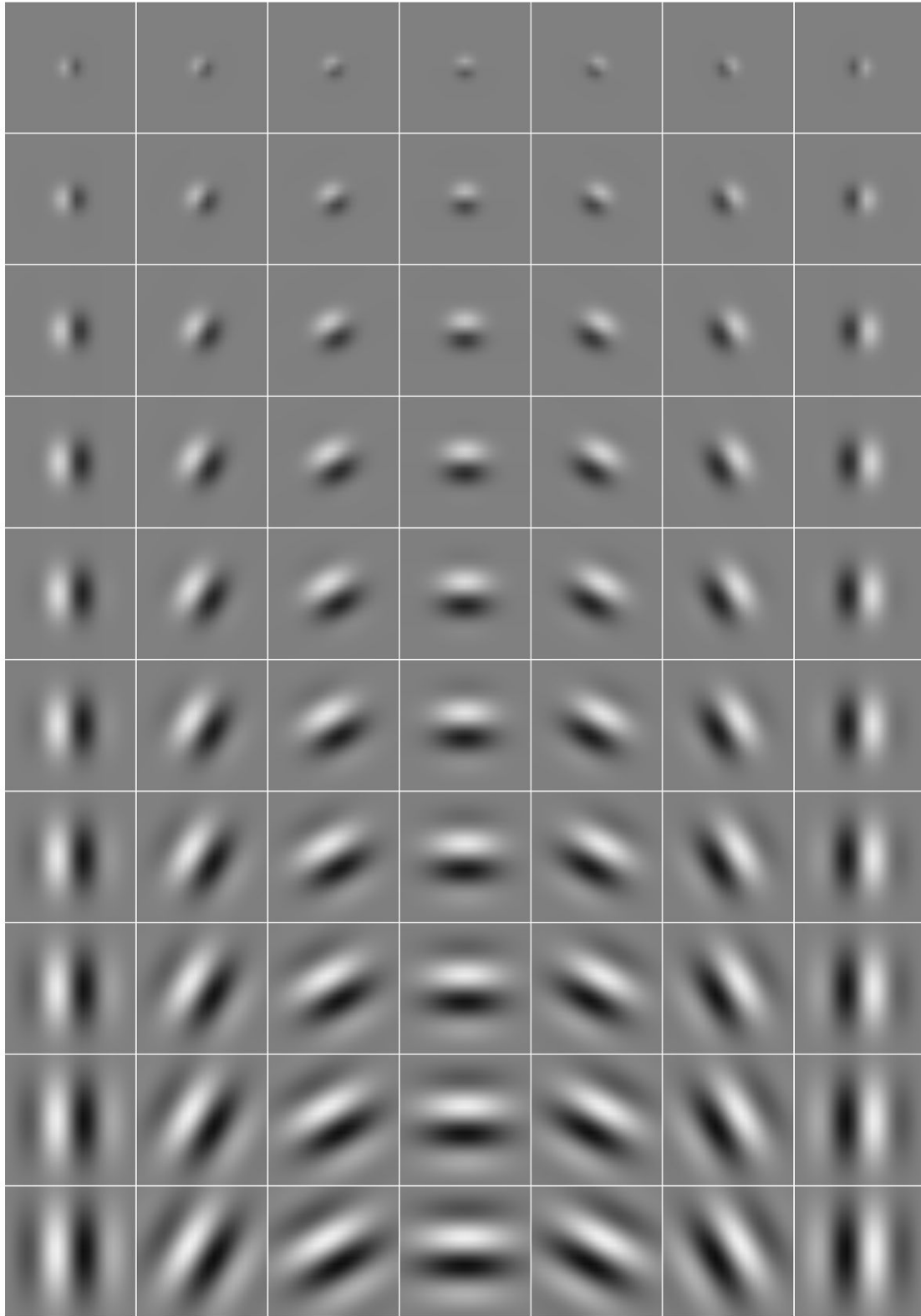


Figura 2.10: Exemplo de banco de filtros de Gabor com  $\sigma = [1 - 10]$  e  $\theta = [0 - 180]^\circ$  – parte imaginária.

na totalidade. A dimensão da imagem, neste caso, determina as faixas de variações de frequências (denominado de número de ciclos por imagem), enquanto que as orientações podem ser definidas em diferentes faixas<sup>4</sup>.

Para computar o números de ciclos necessários para decompor uma imagem, Jain leva em consideração a dimensão da imagem. Considere  $N_c$  sendo a largura em *pixels* de uma imagem que é potência de 2, e os valores de frequência radial sendo determinados por  $1\sqrt{2}, 2\sqrt{2}, 4\sqrt{2}, \dots, (N_c/4)\sqrt{2}$  [67].

De maneira similar, as frequências podem ser obtidas a partir de [68]:

$$F_L(i) = 0.25 - \frac{2^{i-0.5}}{N_c}, F_H(i) = 0.25 + \frac{2^{i-0.5}}{N_c} \quad (2.13)$$

onde  $i=1,2,\dots, \log_2(N_c/8)$ , de modo que  $0 < F_L(i) < 0.25$  e  $0.25 \leq F_H(i) < 0.5$ . Se considerar como exemplo prático de uma imagem de 481x321, haveriam 12 possíveis valores de frequência, que aplicados em 6 orientações resultariam em 72 canais/filtros de informação.

## 2.2 Holografia de Gabor *Inline*

O novo princípio microscópico proposto inicialmente por Denis Gabor é o mais simples dos entendimentos possíveis para a holografia [2]. Denominado de holografia *inline*, esta simples técnica requer apenas uma fonte de luz coerente, uma abertura numérica, um objeto a ser imageado e um sensor de armazenamento das intensidades. Nesta forma de holografia interferências são produzidas pela utilização de um único feixe de iluminação, sem a separação em feixe de referência e feixe de objeto, comumente utilizado na holografia convencional. Em geral, ondas esféricas de luz partem de uma abertura numérica em direção ao objeto, e interferências são capturadas em um plano localizado diretamente atrás do objeto. A representação esquemática da holografia *inline* de Gabor é apresentada através da Figura 2.11 – adaptada de [69]. Um laser  $L$  é utilizado para disparar ondas monocromáticas em uma abertura numérica  $P$  (pinhole), fazendo com que as ondas sejam curvadas conforme as leis da teoria da difração. Ao cruzarem a abertura numérica, ondas

---

<sup>4</sup>Jain utilizou quatro orientações em seu trabalho, sendo  $0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, 135^\circ$ . Outros trabalhos sugerem orientações variando a cada  $30^\circ$  para uma melhor separabilidade da onda.

esféricas são dissipadas a partir de um ponto em comum, que interceptam o objeto  $O$  ao longo do eixo  $z$ . É importante observar que algumas ondas que não interceptarem  $O$  continuarão prosseguindo até atingirem o sensor  $C$ , e estas ondas que não sofreram alteração são denominadas feixe de referência. Ondas que interceptarem  $O$  produzirão padrões de interferência holográficas, que também serão projetadas no mesmo plano  $C$ , sendo denominadas de feixe do objeto, muito similarmente ao que ocorre na holografia convencional. O holograma obtido a partir deste processo apresenta uma amplitude de onda equivalente à  $A(r) = A_{ref}(r) + A_{scat}(r)$ , onde  $A_{ref}$  e  $A_{scat}$  são as ondas de referência e dissipadas pela interferência com o objeto, respectivamente, sob um raio  $r$  da abertura numérica [69]. A intensidade do holograma também pode ser obtida a partir da amplitude

$$I(r) = A_{ref}(r)A_{ref}^*(r) + [A_{ref}(r)A_{scat}^*(r) + A_{scat}(r)A_{ref}^*(r)] + A_{scat}(r)A_{scat}^*(r), \quad (2.14)$$

onde o primeiro termo corresponde à intensidade das ondas não dissipadas do feixe de referência, os próximos dois termos entre  $[\cdot]$  correspondem à interferência produzida entre as ondas de referência e dissipadas, e o último termo corresponde à intensidade das ondas dissipadas do objeto  $O$  [69].

Embora hajam diferentes denominações e configurações para a holografia *inline*, Kreuzer [19], um dos pioneiros da holografia digital *inline* moderna, classifica que a holografia que utiliza este tipo de geometria como Holografia *inline* em *Point-Source*, ou seja, a partir de um ponto em comum da abertura numérica. Configurações semelhantes utilizando feixes de laser podem ser utilizadas, logo há a necessidade de diferenciação deste tipo de holografia das demais. No sistema de holografia digital *inline*, ondas esféricas ou parcialmente esféricas com comprimento de onda  $\lambda$  são disparadas de um ponto comum, com dimensão linear na ordem do próprio comprimento de onda. Através das teorias de difração de onda, pela variação das aberturas numéricas objetos de diferentes tamanhos podem ser imageados variando o padrão de difração produzido pela aparente flexão da onda ao redor ou no próprio interior do objeto.

A holografia *inline* apresenta uma série de vantagens em relação à holografia tradici-



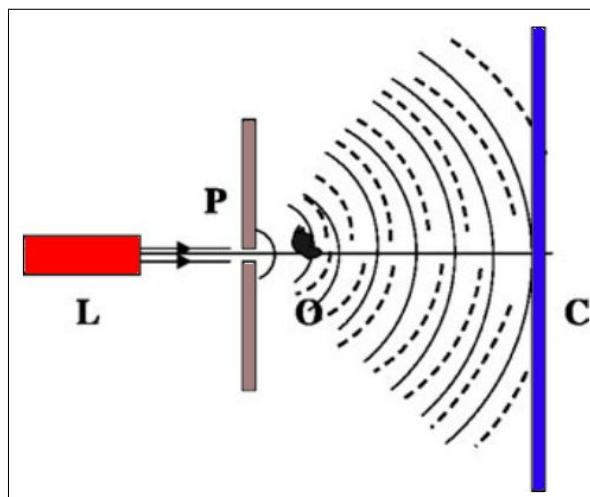


Figura 2.11: Representação esquemática da holografia *inline* de Gabor. Um laser  $L$  é utilizado para focar uma abertura numérica  $P$  (pinhole). Ondas esféricas são obtidas e objeto  $O$  é iluminado, gerando padrões de interferências holográficas, que são capturadas pelo sensor  $C$ .

onal, e desde então a holografia *inline* tem-se mostrado como o método mais apropriado para o imageamento biológico em micro-escala. Primeiramente, a simplicidade na implementação do *setup* é o primeiro aspecto a ser analisado, podendo ser produzidos hologramas utilizando inclusive fontes de luz com baixa coerência [70]. Holografia *inline* pode ser facilmente miniaturizada em plataformas de POC, pode ser reproduzida em alguns centímetros cúbicos, requerindo materiais bastante simples. O segundo aspecto diz respeito à estabilidade do modelo em relação a holografia convencional. Na holografia convencional, o sistema é muito sensível à variações abruptas no ambiente, tal como ruídos ou vibrações, que por menor que sejam podem produzir facilmente o deslocamento do feixe de laser no *setup*, o qual é projetado sobre espelhos e lentes.

Embora uma série de vantagens podem ser apontadas, as primeiras abordagens a utilizarem a holografia *inline* enfrentaram o fato de que, para reconstruir uma imagem holográfica bi- ou tridimensional, o conceito não era prático e simples. A holografia realizada da forma *inline* introduz algumas complicações desde a sua origem, décadas atrás com Denis Gabor. Como o processo de difração numérica é realizado sobre  $O$  alinhado perpendicularmente em relação ao plano  $C$ , ao focar a imagem real através do ajuste de uma distância  $z$ , a imagem virtual aparecerá desfocada sob o ponto de vista do observador. Correspondem às imagens desfocadas dos objetos holografados, produzidos pela super-

imposição sobre as imagens reais dos objetos na reconstrução numérica. Este problema é ilustrado na Figura 2.12, onde o objeto real, após ser atingido por ondas esféricas ou mesmo ondas planares, projeta um holograma no plano-detector de imageamento  $C$ . Ao realizar a difração numérica, a mesma distância  $z$  é utilizada, gerando a imagem virtual. No entanto, as interferências contidas no holograma continuam propagando conforme  $z$  é incrementado, fazendo com que o processo reverso de recuperação mostre a imagem real fora de foco, a uma distância equivalente a  $z * 2$ . Na reconstrução numérica pode ser utilizado uma distância de  $-z$  para perfazer o processo reverso da onda, obtendo a imagem real em foco. A recíproca é uma verdade, e a imagem virtual surgirá também fora de foco na mesma reconstrução. Esta limitação é conhecida como problema da imagem gêmea (*twin-image*) e ocorre no caso da holografia *inline*, e é impossível separar ou isolar uma imagem de outra. Os termos virtual e real podem ser vistos como arbitrários: embora as intensidades das imagens podem não serem as mesmas, tanto a imagem real quanto a virtual contém toda a informação relevante. Portanto, a escolha de qual imagem é mais adequada ( $+z$  ou  $-z$ ) é vista como uma questão de preferência e precedência, do que qualquer outro aspecto técnico [71]. Exemplo de foco da imagem virtual e real desfocada ou vice-versa é demonstrado também na Figura 2.12 através das áreas em destaque na parte inferior da imagem. Pode ser verificado que a letra “U” obtida a partir da difração computacional do objeto mantém as suas características geométricas originais, embora é possível verificar artefatos da imagem gêmea fora de foco, e também em sua imagem correspondente de gradiente.

Esta limitação apresentada na holografia *inline* pode ser tratada basicamente de duas formas: modificação física no *setup* em uma holografia *off-axis*, ou utilização de métodos numéricos para a supressão do efeito da imagem gêmea. Para o primeiro caso, semelhantemente ao que ocorre na holografia convencional, uma angulação é introduzida entre  $O$  e o plano  $C$ , e quando a reconstrução numérica é aplicada, a imagem real e a imagem virtual são separadas [70]. No entanto, esta forma de holografia exige a separação do feixe luminoso, deixando de caracterizar-se *inline*. Holografia *off-axis* também demonstrou-se menos efetiva para o estudo de uma coleção de pequenos objetos devido a restrições

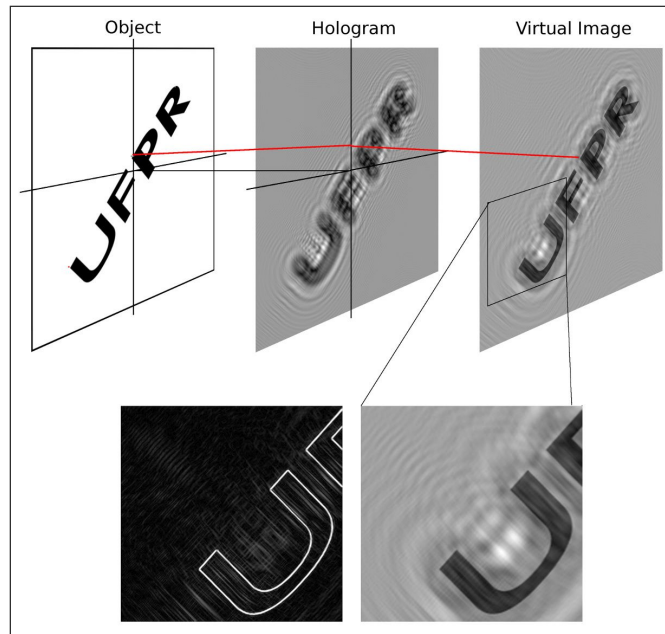


Figura 2.12: Artefatos gerados pela difração numérica devido ao problema da imagem gêmea. O objeto real é interceptado por ondas planares ou esféricas e o holograma é gerado a uma distância  $z$ . A difração numérica é realizada com base na mesma distância  $z$  do plano ao objeto real. Como a holografia é *inline*, artefatos do objeto real ocorrem na imagem virtual.

na amostra e problemas de não robustez a vibrações. Uma segunda abordagem é a utilização de métodos numéricos para a reconstrução sem a interferência da imagem virtual, utilizando equações diferenciais parciais (PDE) e filtros não-lineares [28, 59, 69, 72]. Uma outra abordagem simples, embora não prática é a captura independente da onda de referência sem o objeto de referência. A imagem obtida pode então ser subtraída do holograma para obter o contraste do holograma, e então aproximar a remoção do sinal [33, 19]. O tratamento para o problema da imagem gêmea não corresponde ao escopo da plataforma holográfica proposta, mas claramente deverá ser explorada em mais detalhes em desenvolvimento futuros.

## 2.3 Imageamento Sem-lentes

Imageamento sem lentes<sup>5</sup> é uma categoria de sistemas de imageamento onde a imagem é formada pela projeção das sombras do objeto sobre a superfície de um sensor de imagem, sem a necessidade de lentes. Em geral o imageamento sem lentes é utilizado principal-

<sup>5</sup>ou livre de lentes.

mente na microscopia, onde a amostra é colocada diretamente sob a superfície do sensor, e por isto é também denominada de imageamento *on-chip*. Por característica, o imageamento sem lentes possibilita uma série de aplicações nas áreas biológicas, onde dispositivos compactos, leves e de baixo custo podem ser desenvolvidos. Não obstante, o imageamento sem lentes pode gerar imagens de alta-resolução dentro de uma plataforma portátil, tal como um microscópio óptico, o que é bastante apropriado para dispositivos de POC em ambientes limitados de recursos [27].

Embora o imageamento sem lentes possua relações diretas com a holografia de Gabor, esta categoria surgiu basicamente da possibilidade de uso dos sensores de imagem comercialmente disponíveis, como dispositivos para microscopia de baixo custo. Com o recente progresso na tecnologia de semicondutores, sensores por CCD e CMOS se popularizaram no imageamento sem lentes, impulsionando não somente a holografia digital, mas suas sub-categorias baseadas em imageamento sem lentes.

O imageamento sem lentes apresenta uma série de vantagens em relação aos microscópios por óptica convencional. O principal aspecto que pode ser observado é a simplicidade, fácil miniaturização e serem leves em estrutura de hardware, onde o sistema pode ser facilmente construído utilizando um pequeno número de componentes. A configuração comum de um sistema sem lentes requer apenas uma fonte de iluminação, uma abertura numérica e um sensor de imageamento para a aquisição das imagens. Como o sistema pode ser construído em apenas alguns centímetros cúbicos, plataformas diagnósticas completas podem ser desenvolvidas, possibilitando a portabilidade para diferentes ambientes restritos em recursos. Um segundo aspecto que pode ser evidenciado é em relação ao custo-efetividade que um sistema sem lentes pode proporcionar. Uma grande parte da configuração de hardware inclui equipamentos e componentes disponíveis comercialmente, como por exemplo, sensores por CMOS ou CCD e diodos para iluminação com diferentes frequências e comprimento de onda. Não obstante, a customização torna-se possível neste tipo de plataforma, onde eletrônica com micro-fluídica pode ser combinada de acordo a necessidade e com o tipo de amostra a ser inspecionada. Computacionalmente, análise inteligente de imagem pode ser embarcada na mesma plataforma, possibilitando a conta-

gem e classificação dos achados em uma plataforma diagnóstica totalmente automatizada, utilizando métodos de processamento de imagem e reconhecimento de padrões [27].

Outro aspecto bastante importante em plataformas sem lentes em relação aos microscópios ópticos é o amplo campo de visão (FOV) e profundidade disponíveis para o imageamento. Com a amostra posicionada diretamente sobre o sensor, *i.e.*, uma pequena distância de  $z$ , o campo de visão corresponde proximamente a própria área do sensor. A imagem holográfica com informação volumétrica pode então ser adquirida em um simples *frame*, uma vez que um único holograma contém toda a informação sobre a estrutura 3D da amostra analisada [19]. De acordo com a taxa de amostragem do sensor de imageamento, a holografia em imagem pode ser ainda estendida para vídeo, possibilitando então a análise 4D volumétrica, incluindo a visualização *in-vivo* ou *in-situ*, bem como em tempo real dos espécimens.

Na microscopia óptica, as características acima mencionadas não podem ser completamente satisfeitas, ou são satisfeitas na parcialidade. Inicialmente, o FOV de um microscópio óptico convencional é bastante limitado devido ao conjunto óptico, sendo necessário realizar o mosaico da imagem para escanear uma região maior na amostra. Devido ao limitado campo de profundidade, existe também dificuldade na obtenção e representação 3D e imageamento de amostras vivas quando comparado a uma plataforma sem lentes. A visualização simultânea do posicionamento e movimentação das partículas em um microscópio óptico também tornam-se indisponíveis. Desta forma o imageamento sem lentes com recursos computacionais apresenta-se como uma alternativa bastante promissora em substituição aos volumosos microscópios para uma série de aplicações, especialmente nas ciências biomédicas [27].

### 2.3.1 Sensores para Imageamento Sem-Lentes

Sensores de imageamento são dispositivos essenciais na formação da imagem digital, sendo amplamente utilizados na fotografia digital, indústria aero-espacial, astronomia, equipamentos médicos, e recentemente com uma expressiva participação na indústria de dispositivos móveis. Os principais tipos de sensores de imagem são baseados em dispositivos de

carga acoplada (CCD) ou semi-condutores metal-óxido complementar (CMOS), e o princípio básico de formação de imagem é a captação da informação de luminosidade para posterior conversão em sinal digital. Para este propósito, tanto *arrays* como matrizes bidimensionais contendo milhões de células foto-sensíveis podem ser utilizadas de modo que a imagem é formada quando o sensor é submetido a uma determinada taxa de exposição.

Ambos os tipos de sensores (CCD e CMOS) foram inventados no final dos anos 60, e rapidamente a tecnologia de imagem por CCD tornou-se dominante devido a qualidade fornecida para as imagens, com a tecnologia de fabricação existente na época. Sensores de imagem por CMOS apresentavam limitações de uniformidade de sinal, e somente nas últimas décadas ganharam destaque na indústria. Embora as tecnologias apresentem suas particularidades, ambas apresentam suas vantagens e desvantagens, e a escolha depende do contexto de aplicação a ser utilizado.

Dispositivos de imagem por carga acoplada (CCD) são sensores semi-condutores formados por um circuito integrado, acoplados a uma matriz de capacitores. Neste tipo de sensor a carga das células é transferida em linha entre capacitores vizinhos para um dos cantos da matriz, tal como realizado em registradores de deslocamento. Nos cantos da matriz conversores analógicos recebem o sinal dos capacitores, e o sinal é transformado digitalmente para valores de *pixel*. Como existe um número bastante limitado de nós de saída, existe a necessidade de chaveamento do sistema, de modo que um quadro só poderá ser formado com a transferência de todas as cargas dos capacitores. Este chaveamento acaba limitando a taxa de amostragem dos sensores de imagem por CCD quando comparados aos sensores por CMOS. No entanto, as saídas apresentam uma alta uniformidade do sinal, resultando em imagens de alta qualidade. Por esta razão sensores de imagem por CCD são amplamente difundidos na fotografia digital, imageamento por satélite, astronomia com a fotometria, espectroscopia óptica, dentre outros.

Exemplo de um sensor de imagem por CCD é ilustrado através da câmera industrial de 11 *mega-pixels* apresentada na Figura 2.13, do fabricante *Imperx*<sup>6</sup>, modelo *Bobcat B6620*. O sensor propriamente dito do modelo *KAI-29050* é demonstrado à esquerda, e o conjunto

---

<sup>6</sup><http://imperx.com>



Figura 2.13: Câmera industrial do fabricante Imperx acoplada a conjunto óptico (lado direito), e sensor de imagem por CCD embarcado na câmera (lado esquerdo).

óptico acoplado à câmera é demonstrado à direita. Para o contexto de imageamento holográfico somente o sensor de imagem é considerado, de modo que a amostra é posicionada diretamente sobre a superfície do sensor para a geração dos padrões de interferência. O sensor desta câmera é bastante apropriado para aplicações que requerem um ultra-ampla campo de visão, pois fornece aproximadamente uma FOV de  $\approx 8.72\text{cm}^2$  em um *pixel-size* de  $5.5\mu\text{m}$ , dimensões correspondentes a  $36.17\text{mm}$  na horizontal e  $24.11\text{mm}$  vertical, e resolução de  $6644 \times 4452$  *pixels*.

Sensores semi-condutores metal-óxido complementares (CMOS) são dispositivos de geração de imagem baseados na tecnologia utilizada para a fabricação de micro-processadores. Neste sistema, cada célula foto-sensível está diretamente relacionada a um transistor, responsável pelo processamento local do sinal e tornando o processo de conversão entre carga-voltagem completamente independente na matriz. Por se tratar de uma tecnologia de microeletrônica, sensores por CMOS muito frequentemente podem integrar amplificadores de sinal, micro-processadores, micro-controladores, corretores de sinal e ruído, circuitos digitais, tornando as leituras diretamente em *bits* digitais. No entanto, a aglomeração de componentes traz como penalização uma redução na área útil disponível para a captação de luz. Diferentemente dos sensores por CCD, cada *pixel* realiza a sua própria conversão resultando em baixa uniformidade do sinal, afetando a qualidade da imagem obtida. Por outro lado, por se tratar de uma tecnologia que permite a captura massivamente em paralelo, a largura máxima de banda pode ser explorada, permitindo com que o



Figura 2.14: Câmera industrial do fabricante *The Imaging Source* (direita) acoplada a conjunto óptico, e sensor de imagem por CMOS correspondente (esquerda).

sensor de imagem trabalhe em altas taxas de amostragem para aplicações que usualmente requerem muitos quadros por segundo.

Sensores de imagem baseados em CMOS foram praticamente reinventados em meados de 90 juntamente com o avanço da nanotecnologia, mas ficaram desacreditados por algum tempo devido a complexidade na obtenção de imagens com qualidade. Este fato propiciou aos sensores baseados em CCD ganharem em qualidade, resolução em número de *pixels* e sensibilidade ao longo dos anos. Devido ao reduzido tamanho de *pixel* dos sensores, expectativas quanto ao baixo consumo de energia, possibilidade de integração direta com hardware, e reuso de memória e estrutura de processadores, muito foi investido nos sensores de imagem por CMOS. Embora os benefícios levaram algum tempo para serem atingidos, ocasionando em maior tempo de desenvolvimento e custo do que inicialmente previstos, sensores por CMOS ganharam impulso com a indústria de dispositivos móveis. Atualmente, sensores por CMOS ganharam muito em qualidade de imagem, embora ainda apresentem menor sensibilidade que CCD's, mas devido aos fatores de custo-benefício acabaram por superar os sensores por CCD em volume de consumo.

Exemplo de um sensor de imagem utilizando a tecnologia por CMOS é ilustrado através da Figura 2.14, do fabricante *The Imaging Source*<sup>7</sup>, modelo *DMK 24UJ003* (direita). A câmera possui um sensor CMOS de 10 *mega-pixels*, correspondendo ao *Aptina MT9J003*

---

<sup>7</sup><http://theimagingsource.com>



(esquerda), apresentando um *pixel-size* bastante reduzido de  $1.67\mu m$ , com dimensões de  $6.440mm$  de horizontal por  $4.616mm$  em vertical resultando em um FOV de  $30mm^2$ , em uma resolução de  $3856 \times 2764$  *pixels*. No conjunto de hardware, as câmeras possuem uma taxa de amostragem que varia de 2 a 5 *frames* por segundo de acordo com o modo de operação utilizado.

Atualmente as tecnologias de sensores de imagem por CMOS e CCD são tecnologias bastante maduras, e embora tratam-se de duas tecnologias distintas, algumas características notáveis podem ser verificadas quando sensores de imagem por CCD e CMOS são comparados:

- Sensibilidade à luz dos sensores por CCD é melhor desenvolvida, produzindo imagens de alta fidelidade, alta qualidade e pouca interferência de ruído. Sensores por CMOS utilizam processos tradicionais de fabricação, e a sensibilidade desta forma é menor. Outro ponto é que a tecnologia para a fabricação de células em nano-escala em sensores por CMOS deve ser muito refinada para que os fótons sejam capturadas pelo foto-diodo sem a interferência dos transistores;
- Consumo de energia é elevado em sensores por CCD, e usualmente estão sujeitos a aquecimento. Especificamente nas câmeras industriais utilizando a tecnologia por CCD, sistemas para a dissipação de temperatura podem ser requeridos com o objetivo de evitar super-aquecimento. A tecnologia por CMOS possibilita a fabricação de sensores que consomem pelo menos algumas dezenas de vezes menos energia que sensores por CCD, e por conseguinte apresentam menor temperatura de operação. Este fato possibilita a análise de amostras *in-vivo* nas plataformas CMOS com maior praticidade em relação aos sensores por CCD;
- Sensores por CCD em geral apresentam maior volume e tamanho, enquanto que sensores por CMOS podem ser facilmente integrados e acoplados a estruturas de hardware já existentes. A fácil miniaturização e integração a hardware possibilitam compartilhamento da estrutura de memória e processadores, permitindo a fácil customização da tecnologia;

- A fabricação de sensores por CCD apresenta elevado custo quando comparados aos sensores por CMOS, que podem ser desenvolvidos com a tecnologia de fabricação de microprocessadores padrões;
- Sensores de imagem por CMOS são mais rápidos otimizando o uso da banda e explorando o paralelismo massivo das células foto-sensíveis. Não obstante, o FOV pode ser ajustado e reduzido à frações específicas, e como o processamento é independente (sem chaveamento) a taxa de quadros por segundo é inversamente proporcional ao tamanho da área ativa imageada. Com o imageamento em vídeo utilizando uma alta taxa de *frames* por segundo o imageamento holográfico em 4D é possível de ser realizado.

### 2.3.2 Classificação dos Sistemas de Imageamento Sem Lentes

O imageamento sem o uso de lentes pode ser categorizado em várias modalidades de acordo com as propriedades do sistema de iluminação, tipo de geometria da imagem obtida e mesmo de acordo com os métodos numéricos e algoritmos utilizados para o processamento de imagem [27]. Principalmente no que refere-se ao sistema de iluminação, o imageamento sem lentes pode ser categorizado em iluminação incoerente, coerente e parcialmente coerente, cada qual com suas particularidades e aplicações.

O termo coerência em sistemas de iluminação diz respeito às propriedades temporais e espaciais que podem ser encontradas nas ondas. O termo também pode ser diretamente relacionado ao nível de brilho de uma fonte luminosa, de modo que quanto mais intensa for a luz emitida pela fonte, maior é a probabilidade desta apresentar uma alta coerência de sinal. Para melhor fundamentação, na ilustração<sup>8</sup> da Figura 2.15, todas as categorias pertinentes aos aspectos temporais e espaciais da luz podem ser verificados. Sistemas de iluminação coerentes podem ser originados a partir de sistemas parcialmente coerentes, que por sua vez podem ser também obtidos a partir de sistemas de iluminação não coerentes, segundo a teoria da difração de ondas.

Um exemplo de sistema de iluminação não coerente pode ser verificado na Figura 2.15,

---

<sup>8</sup>Adaptado de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>

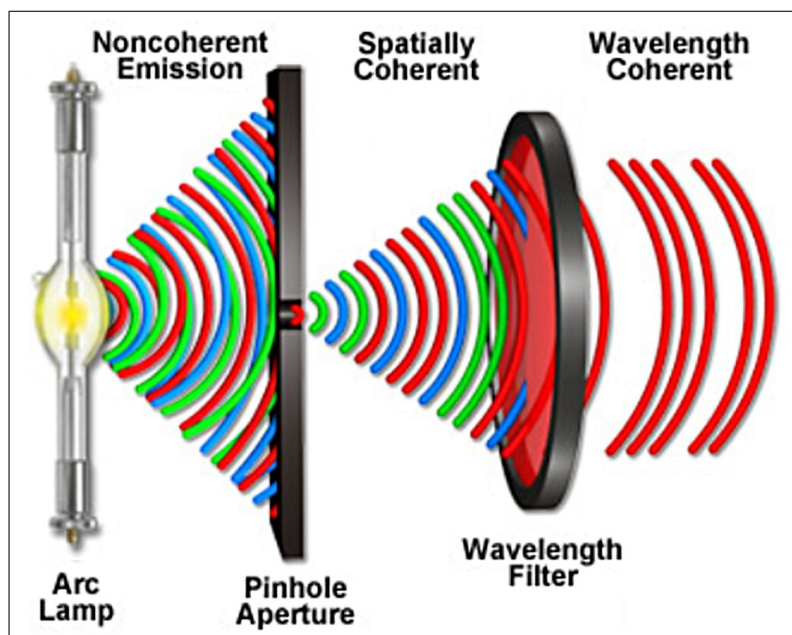


Figura 2.15: Demonstração de sistemas de iluminação coerente e incoerente. Após filtradas por uma abertura numérica e um filtro de comprimento de ondas, o feixe apresenta coerência espacial e temporal.

através do espaço compreendido pela fonte emissora de luz e a abertura numérica. Neste exemplo ondas esféricas com diferentes comprimentos de onda e direções são emanadas a partir de uma lâmpada de mercúrio em arco. O fato de as ondas apresentarem propriedades distintas faz com que sistemas de iluminação não coerentes não sejam apropriados para a reconstrução holográfica. Segundo a teoria da difração, ondas de diferentes comprimentos ao interceptarem objetos tendem a projetar sombras em locais não uniformes, resultando em um efeito de esmaecimento na região do objeto. Desta forma, sistemas de imageamento sem lentes na categoria de iluminação não coerente ficam restritos a somente assinaturas espaciais da amostra imageada.

Iluminação coerente ou parcialmente coerente, por outro lado, ocorre quando processos de filtragem são aplicados sobre o feixe de luz originário (não coerente). Na Figura 2.15, a fonte de luz projeta diferentes tipos de ondas para direções distintas, e após uma abertura numérica ser encontrada, de acordo com a teoria da difração, é postulado que uma nova fonte de ondas esféricas é produzida. Conforme representação da figura, a coerência espacial é obtida parcialmente no sistema, onde as ondas, embora apresentem diferentes comprimentos de onda, emanam a partir de um ponto com o mesmo ângulo

de deslocamento e direção. Através do uso de iluminação parcialmente coerente, a holografia já pode ser aplicada com certas restrições nos aspectos de resolução, uma vez que interferências holográficas já podem ser produzidas. Este sistema ainda torna-se bastante útil no contexto da holografia, correspondendo a uma sub-categoria importante para o imageamento sem lentes. É interessante observar que pela teoria da difração e utilização de uma pequena abertura numérica, é possível negligenciar completamente os aspectos da óptica existentes entre o meio emissor e a abertura numérica, conforme representação na figura.

Idealmente, a holografia é melhor representada quando feixes monocromáticos são utilizados para a produção das interferências holográficas, sendo relacionados com a coerência espacial. Luz monocromática corresponde a projeção de feixes com o mesmo comprimento de onda, a qual pode ser obtida através da utilização de um filtro para eliminação de comprimentos de onda fora da faixa especificada e suportada, conforme representado na Figura 2.15. Através de um sistema de iluminação coerente nos aspectos temporais e espaciais, a holografia pode ser explorada de forma efetiva, onde interferências holográficas com bom padrão de propagação de franjas de onda e contraste podem ser obtidas. A luz monocromática, no entanto, pode ser obtida quando diodos de um mesmo comprimento de onda são utilizados, dispensando a necessidade de filtros de onda, ilustrados na Figura 2.15. O que pode ser observado é que uma grande parte das fontes de iluminação já são baseadas em coerência temporal (e espacial), facilitando a implementação do sistema de hardware para aquisição do sinal com sistemas de iluminação simples e disponíveis comercialmente.

### 2.3.3 Imageamento baseado em Iluminação Incoerente

Sistemas de imageamento sem lentes baseados em iluminação incoerente são os mais simples de serem implementados, pois não requerem uma fonte de iluminação regularizada, tal como laser ou outros avançados componentes ópticos [27]. Podem ser filtradas e obtidas através de um pinhole de algumas dezenas de micrômetros para melhor direcionamento do feixe luminoso.

Devido a limitada resolução espacial produzida pelo sistema não coerente de ilumina-

ção, o imageamento é restrito a ser realizado muito próximo do plano focal (detector). Desta forma, a amostra deve ser colocada o mais próximo possível ou mesmo sobre a superfície do sensor de imageamento, de modo a reduzir a auto-interferência produzida por ondas de diferentes padrões. A resolução e qualidade da imagem obtida é bastante dependente do *pixel-size* do sensor de imagem, sendo que as sombras capturadas apresentam efeito de esmaecimento devido as diferentes propriedades encontradas no sistema de iluminação.

Sombras ou padrões de assinaturas espaciais que são capturadas próximos do plano focal apresentam um amplo campo de visão, em geral correspondendo aproximadamente a própria superfície do sensor. Esta é a principal vantagem desta categoria de sistemas de imageamento sem lentes, permitindo imageamento em larga-escala de amostras em canais de microfluídica, especificamente construídos com as mesmas dimensões da área de imageamento do sensor. No entanto, nesta modalidade de imageamento dependendo das características do sensor, amostras estão sujeitas a aquecimento devido a proximidade, inviabilizando alguns tipos de aplicação, onde a magnificação do sinal também não é possível.

Aplicações para sistemas de imageamento sem lentes utilizando sistemas não coerentes de iluminação podem ser bastante atrativas como ferramentas de citometria [27], e sistemas automatizados para a contagem e categorização de células em larga-escala. Enquanto fontes de iluminação coerente produzem reflexões para toda e qualquer pequena partícula ou mesmo imperfeições no sistema óptico, o imageamento não coerente consegue ignorar vários destes aspectos. Alguns trabalhos correlatos para esta categoria de imageamento sem lentes são apresentados a seguir:

- Uma plataforma miniaturizada de imageamento sem lentes combinando microeletrônica e microfluídica é proposta por [73]. Utilizando um sensor de imagem por CMOS, a plataforma miniaturizada para imageamento por sombras foi utilizada para a investigação dos efeitos comportamentais em nematóides, sendo estes espécimens amplamente utilizados em estudos biológicos e experimentais na genética, radiobiologia, comportamental e envelhecimento. Os nematóides, mais especifica-

mente vermes da espécie *C.elegans* foram imersos em um meio fluídico e imageados pela plataforma sem lentes utilizando um sistema incoerente de iluminação. Para a redução dos efeitos de difração, uma menor distância entre objeto e sensor foi utilizada juntamente com comprimentos de onda menores. O estudo objetivou a verificação a atividade dos nematóides em diferentes variações de temperatura, em correlação com as assinaturas espaciais produzidas pelas sombras capturadas pelo sistema de imageamento;

- Sistemas de imageamento com foco em um amplo campo de visão foram propostos por [14], como uma alternativa aos microscópios ópticos para detecção e contagem de células, onde a resolução não é um aspecto crítico. Utilizando um sensor de imagem por CCD do mesmo modelo apresentado na Figura 2.13, uma plataforma sem lentes com ultra-amplo campo de monitoramento de células foi desenvolvida, a qual pode ser utilizada para detectar e contar células em tempo real. Este sistema é baseado no princípio de imageamento por sombra onde as células são colocadas entre duas lâminas microscópicas de canais de micro-fluídica, e são uniformemente iluminadas com uma fonte de iluminação incoerente fornecida por um LED de luz branca. Nesta plataforma, cada partícula capturada pelo sensor de imagem apresenta assinaturas próprias, possibilitando classificar e diferenciar células. Este trabalho analisa também a distância de difração entre o plano-objeto e o plano-detector, e o diâmetro da sombra projetada sobre o sensor;
- Com base na mesma plataforma e princípio, [74] demonstra o uso da plataforma para um ambiente de testes no contexto de células infectadas por HIV. Chips de microfluídica fabricados através de uma impressora a laser laboratorial foram fabricados com as mesmas dimensões e especificações da superfície do sensor de imagem, facilitando a manipulação no imageamento. Preparadas com anticorpos específicos, as células são imageadas e contadas computacionalmente em segundos. A mesma plataforma foi estendida e estudada em países limitados de recursos tal como a Tanzânia [15];

- Em [75] uma plataforma de imageamento de alta-performance para a categorização e monitoramento de vários tipos de células imersas em soluções heterogêneas é proposta. Um amplo FOV de aproximadamente  $10\text{cm}^2$  é utilizado, onde o sistema pode rapidamente monitorar múltiplas camadas de células em volumes 3D sem a necessidade de lentes, objetivas microscópicas ou mesmo escaneamento mecânico maior área imageada. Utilizando um algoritmo de reconhecimento de padrões, a identificação e localização 3D das partículas é realizada no volume, e diferentes tipos de células e micro-partículas são verificadas de acordo com a assinatura de sombra projetada;
- Também utilizando um sistema de iluminação não coerente, um bio-sensor de cardiotoxicidade em tempo-real foi desenvolvido a partir de um sensor CMOS, extraído de uma webcam disponível comercialmente [76]. O sistema de detecção consiste em um sensor de imagem, um sistema de iluminação com um LED branco e uma abertura numérica. A análise é realizada com base na taxa e as variações entre de batimentos de células tronco embrionárias, conforme ocorre a adição de diferentes tipos de drogas reagentes.

### 2.3.4 Imageamento baseado em Iluminação Coerente

Imageamento sem lentes utilizando fonte de iluminação coerente é capaz de produzir holografia digital com alta precisão e qualidade de sinal. Em outras palavras, holografia é um sinônimo para a aquisição de imagens com resolução espacial superior em comparação aos sistemas não coerentes baseados em sombra. Em geral, fontes coerentes a partir de um único ponto podem ser diretamente utilizadas para construir um sistema coerente de iluminação pelo uso de LED monocromáticos de alto brilho e aberturas numéricas da ordem de alguns micrômetros ( $1\text{--}10\ \mu\text{m}$ ). A coerência em um sistema de iluminação também pode ser definida pelo nível de brilho que uma fonte possui, e fontes luminosas extremamente brilhosas tendem a apresentar um alto grau de coerência espacial e temporal. Um dos mais apropriados exemplos de fontes de iluminação com alta coerência é o laser, que

apresenta a capacidade de focar uma grande quantidade de fótons em uma pequena área em comum, maximizando assim o brilho da fonte de luz. Lasers podem ser diferenciados de um feixe de luz comum devido ao seu alto grau de coerência.

Diferentemente de um sistema não coerente de iluminação, onde somente o campo de brilho em 2D é obtido, na holografia de iluminação coerente a imagem de fase e interferência é obtida, requerendo reconstrução a posteriori por métodos numéricos. Através desta configuração, múltiplos planos focais podem ser obtidos e capturados de maneira a mimetizar o controle de foco realizado em um microscópio óptico convencional. A holografia digital recorda o objeto inteiramente no espaço 3D, ao contrário de microscópios onde somente foco em 2D é possível, além de ser necessário escaneamento mecânico para gerar uma imagem com um amplo campo de visão.

Na holografia *inline* coerente um outro aspecto bastante interessante pode ser reproduzido: a amplificação das assinaturas holográficas. Amplificação de sinal é inversamente proporcional ao campo de visão, e pode ser obtida pelo simples incremento da distância entre o plano-objeto e o plano-detector. Desta forma, as ondas percorrem uma maior distância até o sensor de imageamento, sendo amplificadas por ondas esféricas ou parcialmente-esféricas. Considerando  $z_1$  a distância entre a abertura numérica (P) e o plano do objeto (O), e  $z_2$  a distância entre o plano do objeto (O) ao detector (C), tal como representado nas subseções anteriores através da Figura 2.11. O coeficiente de magnificação do sinal compreende  $M = (z_1 + z_2)/z_1$ , e pode ser tipicamente empregado na ordem de até 10x [19, 27]. No entanto, magnificação exige uma fonte altamente coerente emanando ondas esféricas que estão sujeitas a certa perda do sinal de difração, realizando a amplificação sob certa supressão do nível de *sharpness* da imagem.

Exemplo de amplificação das assinaturas holográficas é apresentado através da Figura 2.16, capturadas através da plataforma holográfica proposta nesta tese. Ao lado esquerdo (a), uma lâmina microscópica foi posicionada diretamente sobre o sensor de imageamento, sem qualquer amostra biológica, capturando as imperfeições existentes na superfície do material. Este padrão de interferência corresponde a riscos encontrados no material em um dos seus planos, demonstrando a sensibilidade que a holografia *inline* pode apresentar,



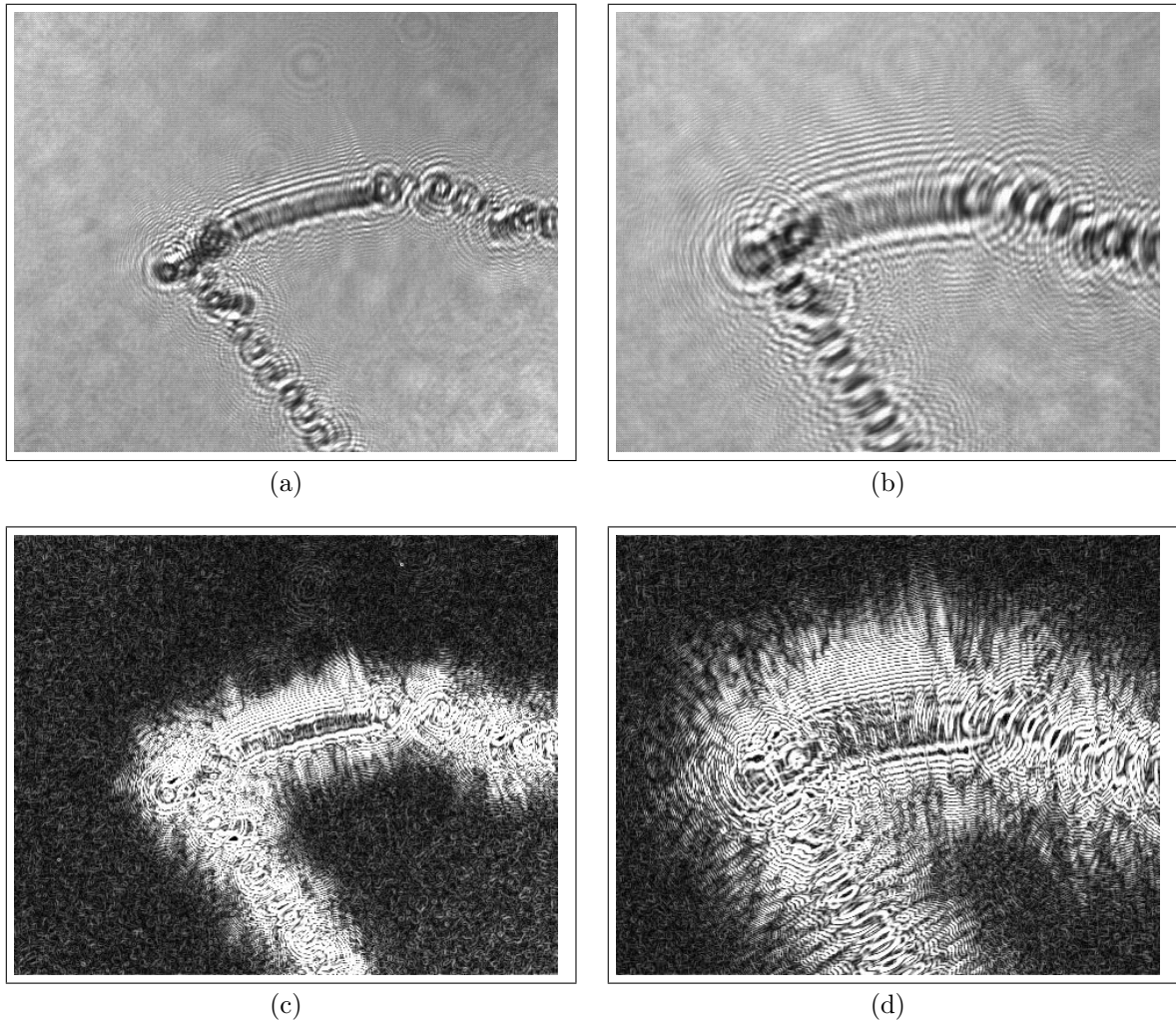


Figura 2.16: Exemplo de magnificação dos padrões holográficos sob a mesma escala. Em (a) o objeto é posicionado diretamente sobre o plano detector, e em (b) uma distância de  $2 - 2.4 \text{ mm}$  foi utilizada. Os gradientes de cada holograma correspondem a (c) e (d), respectivamente.

quando sistemas de iluminação coerente são utilizados. Para produzir a magnificação do sinal em (b), a mesma lâmina foi posicionada a uma altura de  $2.0 - 2.4 \text{ mm}$  em relação ao plano detector, incrementando assim o tamanho das assinaturas holográficas projetadas sobre o sensor de imageamento. Como pode ser observado, a magnificação em holografia não corresponde ao incremento de imagem produzido por uma simples re-escala do domínio planar. Conforme a teoria da difração, obstáculos correspondem a novos pontos de ondas esféricas, e podem ser observados na ilustração que estes pontos correspondem a exatamente as mesmas coordenadas de origem para ambos os casos. O que difere na amplificação do sinal holográfico é a magnificação e propagação das franjas

holográficas a partir do seu ponto de origem, fato este que pode ser também observado através dos gradientes em (c) e (d).

De uma maneira geral, se a coerência do sistema de iluminação for suficientemente alta, os hologramas tendem a projetar mais fortemente as franjas produzidas pela interferência das frentes de onda coerentes, refletidas também de superfícies ópticas internas tal como lentes, espelhos, bolhas na micro-fluídica, e artefatos localizados na lâmina microscópica como poeira ou riscos. Este complexos padrões de interferência podem se manifestar em geral como anéis concêntricos com grande efeito de contraste, mas também são comuns como pontos granulares de alto contraste, super-impostos sobre a imagem. Adicionalmente, na iluminação coerente a transparência dos espécimens analisados pode tornar os padrões de interferência muito mais complexos. Diferentemente do imageamento sem lentes utilizando um sistema não coerente, a holografia *inline* com iluminação coerente é bastante sensível a todos estes artefatos, projetando suas interferências e propagando o sinal holográfico ao longo do meio físico até o sensor de imagem. Em algumas situações, sistemas de iluminação com baixa coerência podem ser preferíveis para suprimir os efeitos anteriormente descritos. Outra alternativa que pode ser bastante interessante para controle da coerência de um sistema de iluminação é o uso de fontes luminosas com controle de foco, possibilitando reduzir ou amplificar a quantidade de fótons sob o objeto a ser imageado.

Trabalhos correlatos utilizando a holografia digital *inline* com coerência espacial e temporal podem ser verificados na literatura:

- Kreuzer et.al. [19] foi um dos precursores da holografia digital *inline* moderna, e em seu trabalho vários aspectos da holografia com base em reconstrução numérica são discutidos para a microscopia. Kreuzer propõe uma plataforma de imageamento para a análise de esferas, algas, bactérias, e outras espécies marinhas em ambientes oceânicos. Kreuzer demonstra a holografia *inline* para a análise *in-situ* de micro-organismos sub-aquáticos tal como *Paramécio*, *Ciliate*, *Didinium* e *Rotifer*. Outras aplicações da holografia *inline* são demonstradas para a análise 4D em micro-fluídica para computar a velocidade das partículas em movimento de fluxos líquidos ou gaso-

sos, evolução do gás na eletrólise e visualização de estruturas em fluxos convectivos ou turbulentos. Dr.Kreuer é um dos fundadores da empresa *4-deep*<sup>9</sup>, sendo uma das pioneiras no imageamento holográfico comercial sub-aquático;

- Em [77], uma plataforma de holografia digital combinada ao conceito de abertura sintética foi proposta. Neste trabalho um mecanismo de multiplexação angular obtido através de um feixe de iluminação inclinado foi utilizado para iluminar a amostra em diferentes direções. Desta maneira, utilizando uma abertura sintética é possível expandir a frequência do sistema de imagem, possibilitando a obtenção de resolução microscópica em ambos os planos transversal e axial. Embora a abordagem proposta possa ser aplicada essencialmente sobre objetos estáticos, com transparência e diluídas em baixas concentrações, o método possibilitou quantificar uma melhora na resolução para o imageamento de amostras biológicas de forma bastante efetiva;
- A visualização de campos de fluxo na holografia digital *inline* em microfluídica foi apresentada por [78]. Neste trabalho, a holografia *inline* é utilizada para visualizar a movimentação de partículas em uma micro-pipeta cilíndrica de 100  $\mu m$  de diâmetro. Um sensor de imagem por CCD é utilizado para capturar hologramas, onde o astigmatismo produzido pela superfície cilíndrica da pipeta sobre o sensor é utilizado para selecionar uma região de interesse no espaço 3D para análise do micro-fluxo e localizar os objetos.

### 2.3.5 Imageamento baseado em Iluminação Parcialmente Coerente

Sistemas de iluminação parcialmente coerente podem ser construídos pela utilização de fontes proximamente monocromáticas, tal como um simples LED combinado com uma abertura numérica na ordem 500-1000  $\mu m$  [17, 47, 27]. Desta maneira é possível ajustar as propriedades de coerência espacial e temporal do sistema de iluminação, possibilitando a geração de padrões de interferência assim como obtido em um sistema coerente. A

---

<sup>9</sup><http://4-deep.com>

grande vantagem é a construção de um sistema holográfico com materiais de custo bastante reduzidos, e utilizando os mesmos métodos numéricos para a recuperação das informações geométricas do objeto imageado.

O imageamento sem lentes utilizando sistemas de iluminação parcialmente coerente é uma sub-categoria de holografia *inline* coerente. No entanto, quanto mais próximo do plano detector a amostra for posicionada durante a aquisição das assinaturas holográficas, melhor será a resolução obtida pelo sistema e menor a degradação do sinal. Na literatura o uso deste tipo de holografia é apresentado a seguir:

- Em [16] uma plataforma de holografia parcialmente coerente para citometria é apresentada. Pelo controle da coerência espacial, padrões de holografia em 2D são adquiridos para cada célula ou micro-partícula localizada no canal de micro-fluídica. Utilizando um sensor CMOS de alta resolução e *pixel-size* reduzido, algoritmos de tomada de decisão são utilizados para classificação das assinaturas holográficas com base na informação da textura, possibilitando realizar a contagem do número de células em uma solução heterogênea. A plataforma demonstrou resultados bastante efetivos como um dispositivo de POC para a citometria, bem como para o diagnóstico de doenças infecciosas;
- Em [17], uma plataforma portátil de holografia utilizando um sistema de iluminação parcialmente coerente para aplicações com foco em telemedicina é proposta. Neste trabalho, uma plataforma de apenas 46 gramas com capacidade de resolução sub-celular foi desenvolvida, atingindo um FOV de  $24mm^2$ ;
- A mesma plataforma descrita anteriormente foi adaptada para um sistema de iluminação em um *array* de 23 LEDs conectados por fibras individuais, proposto por [45, 46]. Através da troca sequencial dos LEDs sincronizados com a captura no sensor de imagem, as assinaturas holográficas são deslocadas a cada novo ponto de iluminação, e as fibras acabam atuando como pequenas aberturas numéricas. Através do conjunto de imagens holográficas obtidas, um algoritmo de super-resolução é utilizado com o objetivo de alinhar as imagens em um domínio planar comum, para

a computação de uma única imagem holográfica de alta-resolução. O alinhamento é realizado através da minimização de uma função custo, designada para realizar deconvolução. O algoritmo para a reconstrução da informação holográfica é baseado em um modelo iterativo, que após um número de iterações ser completado, a informação de geometria do objeto é obtida;

- Em [31], é apresentada a simulação de uma simples técnica de super-resolução baseada na iluminação realizada a partir de diferentes orientações e posições. Um feixe com 25 fibras é utilizado posicionados em relação a fibra central, onde as posições e orientações são relacionadas a troca do espectro do objeto no plano de abertura. Um sensor por CCD captura as assinaturas holográficas de cada fibra sequencialmente, e a troca do espectro é equivalente a integral múltipla do comprimento da abertura, e através de algoritmos específicos uma única imagem em alta-resolução é obtida. Embora uma simples simulação, os resultados obtidos apresentaram uma melhora de resolução de vezes em relação a uma única imagem;
- Utilizando a mesma plataforma anteriormente descrita em [45, 46] e similar ao trabalho apresentado por [31], um modelo de scanner radial tomográfico foi proposto para análise volumétrica utilizando holografia *inline* com fonte de iluminação parcialmente coerente [47, 48]. Embora a ideia de imageamento a partir de diferentes pontos de visão já tenha sido utilizada em outras abordagens, neste trabalho a resolução espacial atingida foi de  $\approx 1\mu m$  dentro de um volume de  $\approx 15\text{ mm}^3$ ;
- Em uma outra abordagem, [49, 50] realiza o imageamento e *tracking* em 3D de células reprodutoras masculinas, através de duas fontes de luz com comprimento de onda variados. Cada fonte luminosa é posicionada nos planos verticais e oblíquos, que sequencialmente capturam hologramas das células em movimento. Algoritmos de rastreamento são utilizados para computar as trajetórias das células no meio líquido, possibilitando a identificação de comportamentos bastante raros não antes observados em microscópios convencionais.

### 2.3.6 Outras Plataformas de Imageamento Sem-Lentes

Na literatura ainda podem ser verificadas plataformas bastante interessantes para o imageamento sem lentes, que podem utilizar sistemas de iluminação incoerente, parcialmente coerentes e coerentes. Algumas abordagens são totalmente dedicadas para o melhoramento da qualidade das assinaturas holográficas pelo uso de câmeras industriais com alta taxa de amostragem na ordem de milhares de *frames* por segundo. Desta forma, amostras imersas em soluções ou mesmo canais de microfluídica tem a sua informação de sub-*pixel* computada através de deslocamentos muito pequenos da sombra sobre a superfície do sensor de imagem. A computação do sub-*pixel* é possível pois as células foto-sensíveis do sensor de imagem capturam pequenas variações das intensidades conforme ocorre o deslocamento temporal da amostra. O deslocamento da amostra sobre a superfície do sensor pode ser mecânica com um *stager* de alta precisão, ou através da aplicação de pressão constante na abertura do canal de microfluídica enquanto a câmera captura as assinaturas espaciais ou holográficas. Embora o elevado custo de aquisição para câmeras de alta velocidade ou mesmo *stagers* com precisão microscópica, esta categoria de plataforma é capaz de atingir resolução menor que  $1\mu m$  [42, 43, 44]. Não obstante, o custo computacional para o rastreamento das partículas durante o deslocamento combinados com super-resolução tornam a aplicação restritiva para o contexto de POC e processamento em tempo-real.

## CAPÍTULO 3

### PLATAFORMA HOLOGRÁFICA INLINE PROPOSTA PARA O IMAGEAMENTO SEM LENTES

Neste Capítulo a plataforma proposta para o imageamento sem lentes baseada em holografia digital *inline* é apresentada. A plataforma é subdividida em 2 protótipos de hardware e software: (a) plataforma para imageamento de amostras estáticas com múltiplos *frames* para melhoramento da qualidade dos hologramas e supressão de ruído; (b) plataforma para holografia 4D em vídeo *in-situ* de amostras biológicas e micro-organismos. Para ambos os casos, o mesmo sensor de imagem é utilizado, com diferenças principais envolvendo a arquitetura do *setup* e sistema de iluminação.

Para a plataforma (a), um sistema de deslocamento da posição do feixe de luz para a aquisição de múltiplas observações da mesma amostra foi desenvolvido. Através do movimento da fonte luminosa, as sombras correspondendo aos sinais holográficos são também deslocadas sobre o sensor, sendo esta uma das premissas básicas para o melhoramento da resolução pela computação da informação de *sub-pixel*. Esta plataforma utiliza uma fonte luminosa de baixo comprimento de onda (ultra-violeta), possibilitando o imageamento de pequenas estruturas tal como células humanas reprodutoras masculinas na ordem de alguns micrômetros.

A segunda plataforma proposta (b) tem como foco o imageamento *in-situ* de estruturas microscópicas em vídeo com uma alta-taxa de amostragem de *frames* por segundo. Através desta plataforma, uma série de micro-organismos vivos podem ser visualizados, por exemplo, através de água acumulada em ambientes residenciais internos e externos. Para este protótipo, devido a necessidade de captura em vídeo com alta taxa de amostragem, não há melhoramento na qualidade dos hologramas obtidos. Embora o sensor possua capacidade máxima de somente 2.5 a 3.2 *frames* por segundo, pela natureza dos sensores de imagem por CMOS é possível explorar a independência de *pixels* na captura,

e com a limitação da FOV capturas com até 60 *frames* por segundo podem ser verificadas. Esta plataforma por ser mais simples pode ser facilmente miniaturizada em alguns centímetros cúbicos, e a iluminação parcialmente coerente pode ser realizada através de um LED comercial de baixo custo.

Para ambas as plataformas apresentadas o processo de reconstrução dos hologramas pode ser realizado pelos mesmos métodos numéricos de difração escalar, com alterações nos seus parâmetros de execução. Em termos de fluxo operacional, as plataformas diferem em sua pipeline de processamento, conforme apresentado nas próximas subseções.

### 3.1 Plataforma Holográfica de Microscopia Baseada em Múltiplos Frames

Nesta seção será apresentada a plataforma de microscopia na qual os conceitos da holografia digital *inline* são combinados com aspectos de melhoramento de resolução através da computação de múltiplas observações da amostra. Com foco na formação da imagem do holograma, deslocamentos espaciais da fonte luminosa ao longo do tempo possibilitam ao detector capturar imagens semelhantes, mas ligeiramente diferentes de conteúdo em nível de *pixel*. Através da combinação das múltiplas imagens holográficas em uma única imagem com maior quantidade de *pixels*, informação da propagação dos hologramas pode ser recuperada, ao mesmo tempo que supressão de ruído é realizada. Uma vez obtidas, as imagens holográficas de alta resolução são convertidas em informação morfológica do plano-objeto.

#### 3.1.1 Descrição Experimental do Setup

Para realizar a captura dos hologramas e produzir o deslocamento da fonte luminosa, uma plataforma foi especificamente desenvolvida conforme ilustração simplificada apresentada na Figura 3.1. A plataforma pode ser sumarizada nas seguintes partes conforme a figura, sendo (a) fonte luminosa, (b) uma abertura numérica (pinhole) acoplada a um sistema de deslocamento nos planos  $x$  e  $y$ , (c) a amostra a ser analisada em meio fluídico através



de uma lâmina microscópica, e (d) o detector / sensor de imageamento CMOS para a captura das assinaturas holográficas.

A fonte de iluminação demonstrada na Figura 3.1 (a) é um LED ultra-violeta com baixo comprimento de onda correspondendo a  $385\text{ nm}$ , modelo M385L2 do fabricante/fornecedor ThorLabs, e a pinhole utilizada para filtragem do sistema de iluminação corresponde a  $5\text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro. A pinhole é posicionada diretamente sobre o diodo ultra-violeta, e ambos os componentes deslocam-se livremente no plano  $x-y$  através de uma base ou *stage* construído especificamente para a movimentação planar do sistema de iluminação. Devido ao baixo comprimento da onda originária, frentes de ondas emanam a partir da abertura numérica, interceptando a amostra a ser inspecionada, conforme representação em (c). A amostra pode ser inspecionada em chips com canais de micro-fluídica ou em lâminas microscópicas com uma cobertura de vidro retangular e transparente, apresentando uma espessura bastante fina. É interessante observar que variações na espessura das lâminas microscópicas não afetam o processo de aquisição das assinaturas holográficas, embora seja desejável apresentarem sempre as mesmas especificações. Variações de espessura das lâminas ou mesmo das coberturas de vidro podem afetar a configuração da difração numérica, onde a distância entre plano-objeto e detector necessita ser ajustada devido à sensibilidade do sistema para escala de micrômetros.

Logo abaixo da amostra encontra-se o sensor de imageamento por CMOS, conforme representado na Figura 3.1 (d). O hardware possui aproximadamente  $1/2$  polegada ( $36.0\text{mm}$  x  $36.0\text{mm}$  x  $5.7\text{mm}$ ) com circuito integrado e conexão por USB 2.0, e o sensor de imagem é um Aptina de 10 megapixels modelo MT9J003STM, monocromático e com dimensões de  $6.413\text{mm}$  x  $4.589\text{mm}$ , fornecendo um campo de visão (FOV) de  $\approx 30\text{mm}^2$  em uma resolução de  $3840 \times 2748\text{ pixels}$ . O tamanho do *pixel* do sensor é de  $1.67\text{ }\mu\text{m}$ , possibilitando captura com uma profundidade de  $8\text{-bits}$  a uma taxa de amostragem máxima de  $3.2\text{ frames}$  por segundo. Este sensor apresenta uma *SDK* (*Software Development Kit*) que possibilita uma série de vantagens quanto ao controle do sensor de imagem e configurações de aquisição. Na holografia, é importante que a informação seja obtida através do dado *raw*, sem a interferência produzida por efeitos de pós-processamento, ganho de *pixel*,

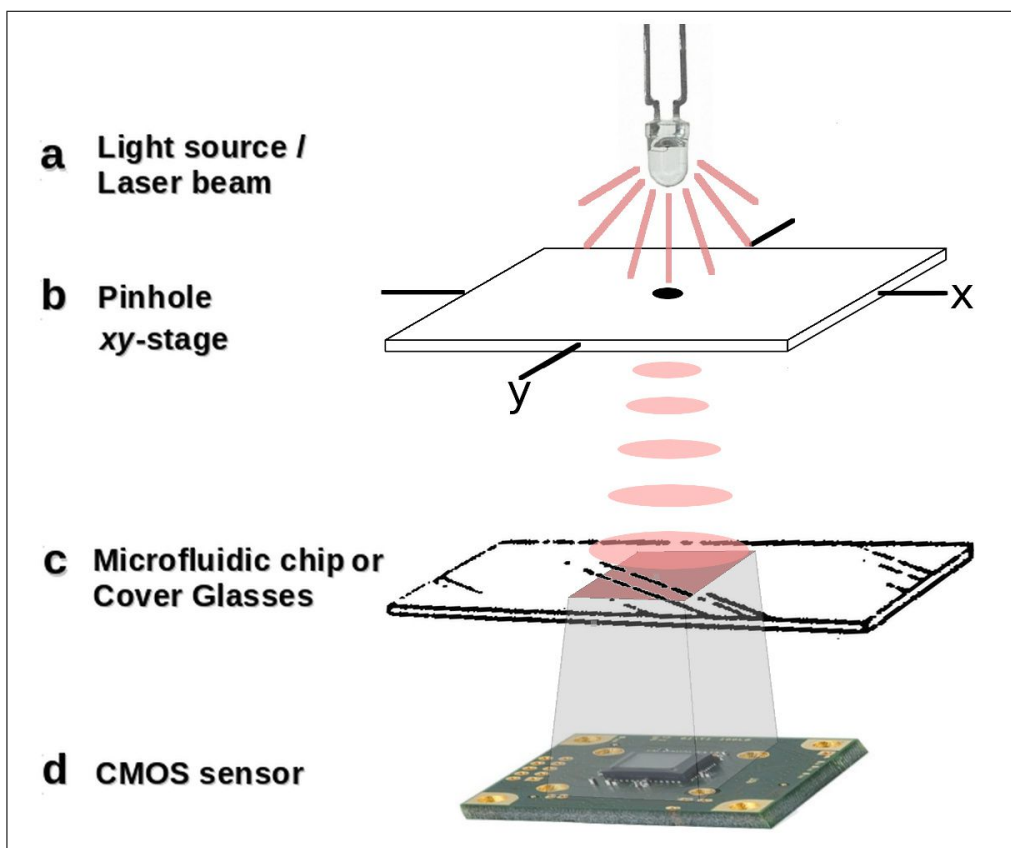


Figura 3.1: Descrição dos componentes utilizados para a plataforma holográfica proposta para a captura de múltiplos *frames* da amostra.

correção de gama, ou *anti-aliasing*. O dado *raw* é bastante importante especificamente nesta configuração de *setup*, pois a computação de *sub-pixel* para obtenção de uma imagem de maior resolução necessita estar livre da influência de tais fatores externos. Pelo uso da *SDK*, a informação da imagem no sensor pode ser obtida diretamente por código próprio, dispensando a necessidade de código ou programas proprietários. Outro fator é a fácil integração dos processos de aquisição com análise automatizada da imagem, onde processos de auxílio na tomada de decisão ao diagnóstico médico podem ser realizados na plataforma.

Para comportar os componentes de hardware ilustrados na Figura 3.1, uma estrutura foi construída em uma impressora a laser de  $CO_2$ , modelo *Versa Laser 2.3*, utilizando placas de Polimetilmetacrilato (*PMMA*). *PMMA* é um termo-plástico sintético de espessuras variadas com aparência de uma folha de vidro, facilmente maleável quando aquecido, sendo um dos materiais mais utilizados para o processamento com laser. *PMMA* pode ser

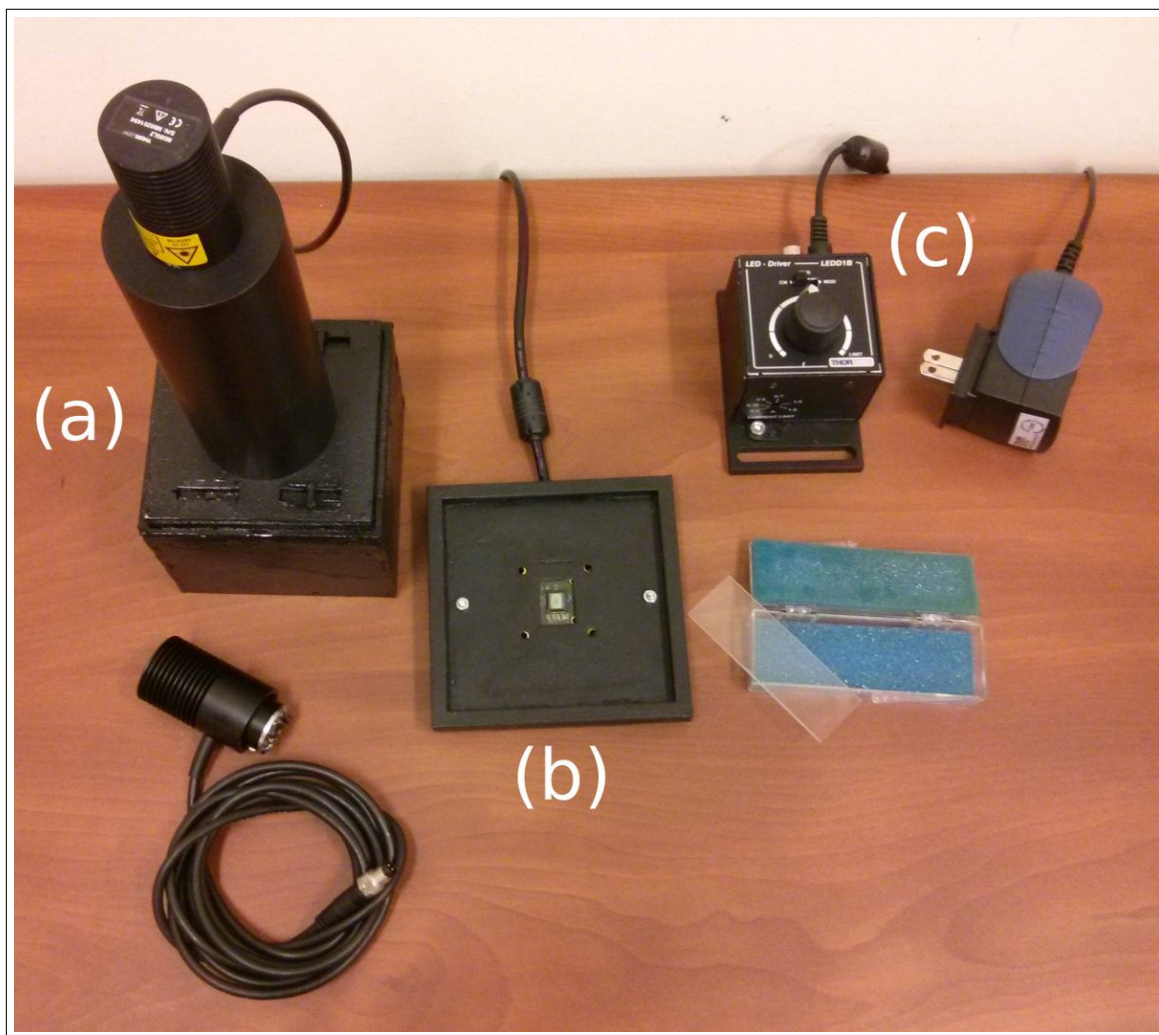


Figura 3.2: Protótipo da plataforma holográfica de microscopia e partes componentes. Em (a) sistema de iluminação e base de deslocamento do sistema de iluminação. Em (b), base da plataforma com sensor de imagem acoplado. Em (c) controle de intensidade do sistema de iluminação.

transparente, opaco ou de cor preta, sendo este último importante para a construção das partes componentes da plataforma, uma vez que a inspeção da amostra deve ser realizada em uma câmera escura, sem a interferência externa de outros pontos de iluminação, senão a ultra-violeta. Os moldes estruturais, após cortados em placas de *PMMA* de 3 *mm* na impressora a laser, foram conectados e colados em diferentes partes sendo as principais: (i) plataforma para deslocamento da fonte luminosa em  $x - y$ ; (ii) câmera escura para fechamento e isolamento do ambiente de imageamento; (iii) base para acoplamento do sensor e cabo USB, e acomodação da amostra a ser inspecionada.

O resultado dos moldes possibilitou o desenvolvimento do protótipo de hardware apre-

sentado na ilustração da Figura 3.2. Na Figura 3.2-(a) o sistema de iluminação ultravioleta foi acoplado a um cilindro de metal opaco de diferentes partes, que podem ser conectadas ou decompostas para a obtenção de diferentes níveis de altura para a fonte de iluminação. A estrutura cilíndrica, por sua vez, é conectada à plataforma de deslocamento nos planos  $x - y$  na qual é fixada diretamente na câmera de iluminação. Na Figura 3.2-(b) é demonstrada a base da plataforma de imageamento, com o sensor posicionado ao centro. É possível verificar o sensor de imagem fixado pela parte de baixo da plataforma, possuindo dimensões de  $10 \times 10 \text{ cm}$ , e a amostra pode ser posicionada livremente sobre a superfície da base da plataforma. Na Figura 3.2-(c) é demonstrado um controlador de intensidade da fonte luminosa, que pode ser utilizado opcionalmente juntamente com a plataforma proposta para ajuste da taxa de exposição do sensor de imagem.

Na Figura 3.3, é possível analisar ainda a plataforma sob outro ponto de vista. Em (a) a plataforma de deslocamento do feixe luminoso conectado ao cilindro da fonte de iluminação são apresentados, encaixados sob a base da plataforma. Nesta mesma figura é possível verificar na região em destaque as ranhuras milimetradas impressas no topo da plataforma, com o objetivo de realizar deslocamentos controlados, detalhados na seção de resultados experimentais. Em (b) é possível verificar como o sensor de imagem é acoplado à base da plataforma pela parte de baixo. Para tal, uma estrutura de *PMMA* é utilizada para fixar os cantos do sensor de imagem, na base da plataforma que também é moldada em profundidade de maneira a acomodar o sensor e o conector USB. Parte dos moldes desenvolvidos para a plataforma proposta são também ilustrados em (c), correspondendo ao molde do  $x - y$  stage para deslocamento da fonte luminosa.

Através da plataforma proposta é possível realizar a aquisição de múltiplas imagens sob diferentes pontos de perspectiva em relação à fonte de iluminação. Exemplo da utilização da plataforma holográfica de microscopia proposta é apresentado através dos resultados da Figura 3.4. Utilizando deslocamento no plano vertical da plataforma com o mesmo ponto de origem na imagem adquirida do sensor, distintas observações da amostra são apresentadas. Como pode ser verificado, o deslocamento da fonte de iluminação causa consequentemente o deslocamento das assinaturas holográficas sobre o sensor de imagea-

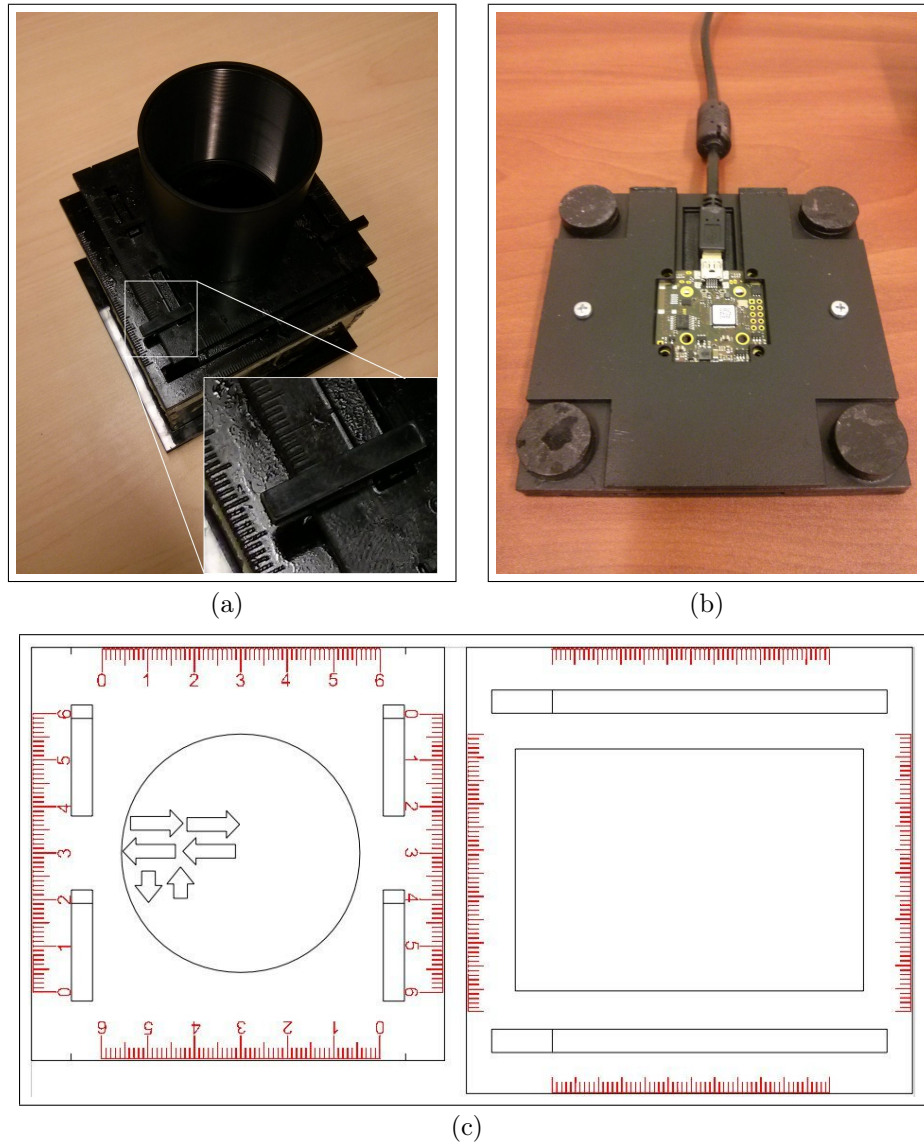


Figura 3.3: Protótipo da plataforma holográfica de microscopia e partes componentes sob diferente ponto de vista.

mento. Ao deslocar a fonte, cada célula do sensor captura novos padrões de intensidade, que podem ser utilizados para computação da informação de *sub-pixel* em uma imagem holográfica de maior resolução.

Outro aspecto que pode ser observado diz respeito ao alinhamento que a amostra deve ter em relação à superfície do sensor de imagem. O sensor é posicionado no centro da base da plataforma conforme Figura 3.2-(b), diretamente pela parte inferior a uma profundidade equivalentemente próxima à sua altura, de modo a lâmina microscópica poder deslizar livremente sobre a base da plataforma, mas sem contato com o sensor de imagem. Apesar da distância muito reduzida entre o sensor e a amostra, é importante



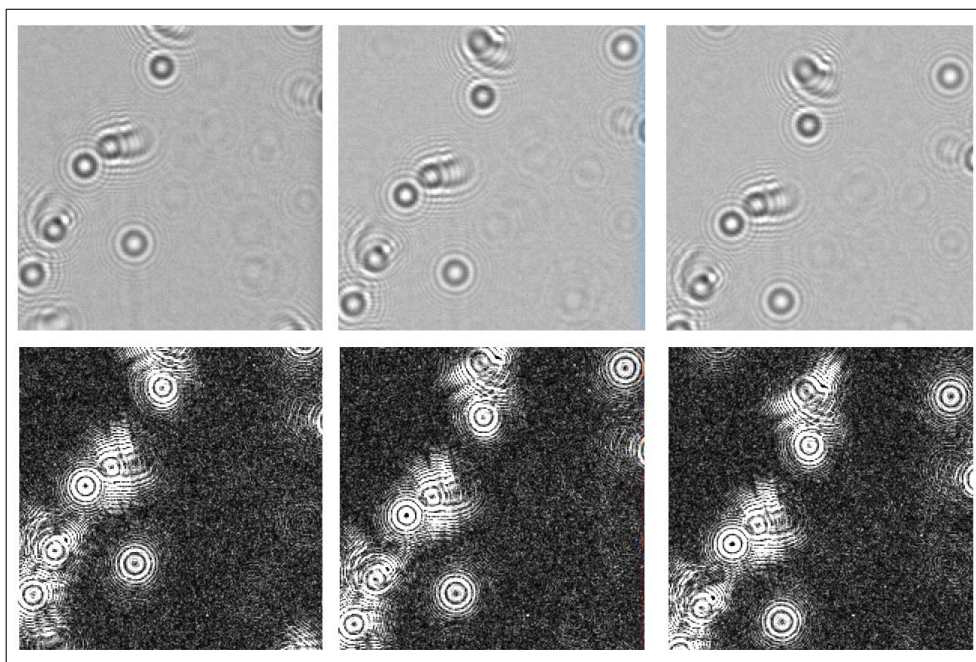


Figura 3.4: Resultado da aquisição de hologramas em células reprodutoras masculinas, com o deslocamento da fonte luminosa no eixo vertical.

que a superfície do sensor e a lâmina da amostra a ser inspecionada estejam em planos *quasi*-paralelos. Pela teoria da difração, diferentes distâncias dos planos detector-objeto podem dificultar no ajuste de foco realizada pelo método numérico de difração, e este requisito de alinhamento deve-se também as seguintes razões:

- Primeiramente, lâminas microscópicas combinadas com lamínulas de vidro (*cover-glasses*) devem ser utilizadas para reduzir a profundidade existente no meio fluídico. A amostra é colocada sobre a lâmina microscópica, e coberta com uma lamínula, forçando com que o fluído esteja proximamente no mesmo plano-objeto em  $z$ . Para o caso de canais de microfluídica, dependendo da altura do canal (geralmente entre  $50 - 100\mu m$ ), invariavelmente haverão partículas em diferentes posições dentro deste mesmo volume;
- A distância entre a amostra, posicionada sobre a base da plataforma em uma lâmina ou canal de microfluídica, e o sensor de imagem, deve ser a menor possível a ponto de poder ser ignorada. No entanto, esta não é uma verdade absoluta, pois distâncias em escala de nanômetros ou mesmo micrômetros podem ser verificadas entre a amostra alvo e a célula do sensor de imagem, onde o sinal é efetivamente capturado. Para

este caso, a amostra deveria ser colocada diretamente sobre a superfície do sensor sem a utilização de lâminas microscópicas, o que tornaria a utilização da plataforma não prática;

- O não alinhamento entre o sensor de imagem com a amostra, ou seja, planos não paralelos, produzem distorções e não uniformidade para hologramas localizados em diferentes pontos no FOV. Idealmente, planos paralelos devem ser utilizados entre o plano-objeto e o plano-detector, e caso variações de alinhamento ocorram, valores específicos de distância poderão ser requeridos na difração numérica para diferentes pontos na FOV.

### 3.1.2 Abordagem de Melhoramento de Resolução em Multi-Frame

Em um sistema de aquisição de imagens, resolução é um dos aspectos mais críticos a serem considerados. Resolução é a capacidade de um sensor ou detector observar ou mesmo mensurar os menores objetos perceptíveis na cena, com clara distinção da sua informação de fronteira. Embora exista uma clara diferença entre os aspectos de resolução e *pixel*, ambos os termos apresentam uma relação bastante direta entre si. *Pixel* corresponde a unidade atômica em uma imagem, ou seja, é o menor fragmento existente em um domínio planar. Para o contexto de uma imagem, é possível aumentar a resolução pela utilização de mais *pixels*, de modo que a representação da visão de mundo seja a mesma.

No contexto da holografia digital, embora a resolução de uma imagem dependa muito mais essencialmente do tamanho do *pixel-size* que um detector apresenta, alguns limites físicos podem ser superados computacionalmente pela obtenção de uma imagem holográfica com maior resolução e a densidade de *pixels* seja maior [34, 35]. De acordo com a literatura, é possível melhorar a resolução de uma imagem através do incremento do seu número de *pixels* pela aplicação de métodos computacionais sobre a própria imagem de entrada [36]. Para esta categoria de super-resolução, um quadro único da imagem é utilizado, mas aspectos físicos do sensor devem ser conhecidos previamente, e então uma função de espalhamento (*Point-Spread-Function* – PSF) pode ser estimada na imagem. Métodos de

convolução são então aplicados juntamente com a PSF no sentido de de-convolver uma imagem ampliada [37]. Na holografia digital, no entanto, o sistema de iluminação em geral envolve fontes coerentes projetando frentes de onda, de modo que o processo de formação da imagem é linear no campo complexo [38]. Efeitos de cancelamento ou anulação do sinal holográfico, ou mesmo a introdução de efeitos não lineares podem ocorrer pela aplicação da PSF. Sinais holográficos especialmente de alta-frequência, onde a informação da onda está codificada de forma bastante reduzida em nível de *pixel*, pode ser modificada e perdida ao longo da aplicação linear de uma função de espalhamento.

Uma outra forma conhecida de melhoria da informação de resolução é pela extrapolação do número de observações da cena que o detector pode realizar. Através de uma amostragem estatística, múltiplas observações consecutivas da mesma cena tendem a introduzir no conjunto de imagens pequenas variações em luminosidade ou ruído, que podem ser recombinadas em uma nova imagem de resolução maior [39, 40, 41]. Desta forma, pela simples somatória da informação temporal é possível suprimir pontos de gradiente não periódicos, com incremento da qualidade da informação visual da cena. No caso do deslocamento da informação visual sobre a superfície do sensor de imagem, a informação adquirida é mais diversificada, uma vez que não somente diferentes intensidades, mas pontos de observação são introduzidos ao conjunto de imagens. No entanto, existe a necessidade de processamento computacional adicional em relação ao registro das imagens no mesmo domínio planar.

No exemplo da Figura 3.5 são demonstrados hologramas correspondendo ao mesmo objeto na cena, com uma pequena variação da informação de luminosidade devido ao deslocamento da fonte luminosa. Para facilitar a compreensão, a informação em nível de *pixel* é apresentada, onde é possível constatar diferenças em termos de valor de luminância capturadas pelas células foto-sensíveis do sensor de imageamento. Para amostras estáticas, *i.e.*, onde a captura em vídeo não é necessária e a amostra não apresenta movimentação, o uso de múltiplos *frames* de uma mesma cena pode ser uma alternativa bastante interessante para estimar a informação de *sub-pixel* entre os hologramas.

Uma vez que as múltiplas observações da cena sob diferentes posições são obtidas, o



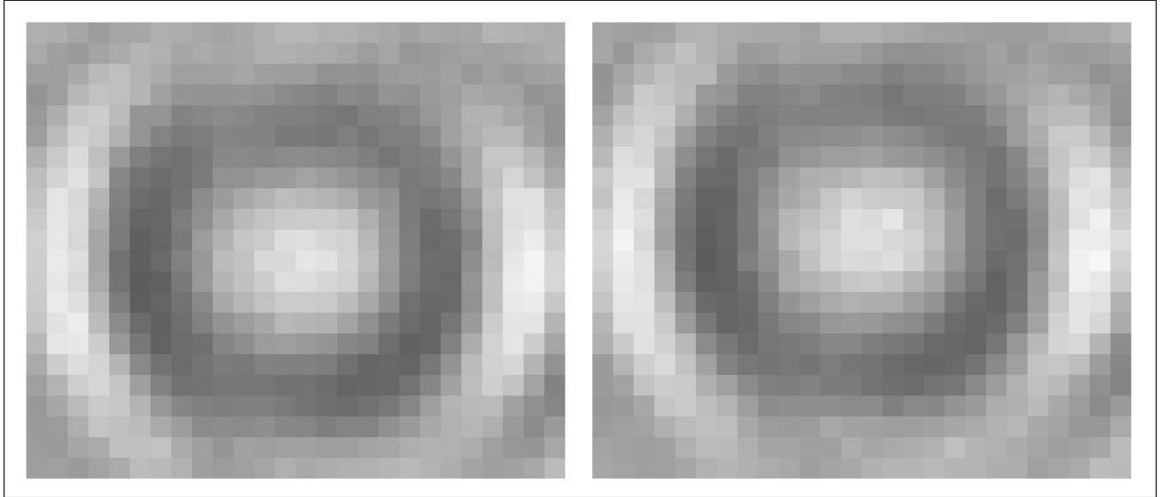


Figura 3.5: Hologramas obtidos pela plataforma holográfica proposta submetidos ao deslocamento da fonte de iluminação. Para efeitos de comparação a informação em nível de *pixel* é apresentada.

conjunto de imagens é armazenado e algoritmos de processamento de imagens e reconhecimento de padrões são aplicados sobre o conjunto. Por definição, um conjunto de imagens utilizado para composição de uma única imagem de alta-resolução é denominado de conjunto de baixa-resolução, embora seja adquirido utilizando a resolução máxima disponível no sensor de imageamento. Para a metodologia proposta, o número total de observações de uma mesma cena corresponde a 49 images, sendo capturadas com deslocamentos aproximadamente a cada  $1mm$  na plataforma em uma matrix de  $7 \times 7$  posições. O número total de imagens escolhidas para formação do conjunto de baixa-resolução é arbitrário, embora estatisticamente um maior número de imagens torna favorável a recuperação de um maior nível de informações.

Uma visão geral da metodologia utilizada é demonstrada através da ilustração da Figura 3.6. Utilizando a plataforma previamente descrita, o conjunto de baixa-resolução é obtido com deslocamentos da fonte de iluminação. A próxima etapa da abordagem computacional é o processamento do conjunto baixa-resolução, onde através de procedimentos de registro das imagens no mesmo plano, e processos de otimização do alinhamento em nível de *sub-pixel*, melhoramentos são obtidos e armazenados em uma única imagem de maior resolução. Esta etapa é composta a partir de dois processos executados em sequência: (a) alinhamento rápido das imagens ou de um sub-domínio planar  $\Omega$  com base em

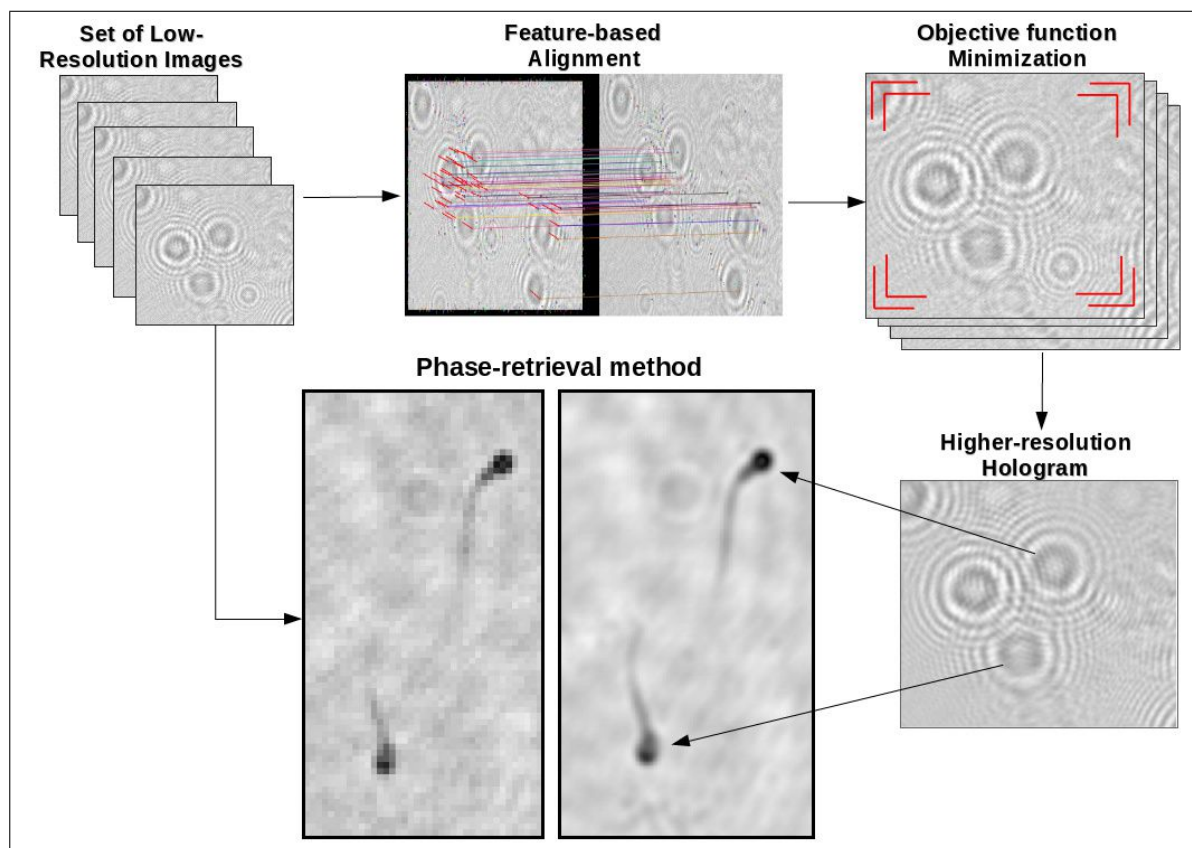


Figura 3.6: Diagrama de fluxo da plataforma holográfica proposta com o objetivo de melhoramento da resolução e supressão de ruído. Após a obtenção de hologramas em alta-resolução, métodos numéricos de difração convertem o sinal em informação morfológica do plano-objeto.

características do conjunto, e (b) minimização de uma função objetiva de custo designada para otimização do nível de alinhamento apresentado entre os hologramas no conjunto. Esta função de minimização é baseada em modelos variacionais, onde a minimização de uma função de energia possibilita uma boa aproximação para o alinhamento, e esta função é modelada para otimização da propagação das ondas e do nível de *sharpness* do sinal holográfico. A função objetiva é composta por um termo de fidelidade para manter a localidade espacial, e outro termo para mensurar o nível de *sharpness* no domínio planar. A minimização da função é orientada por um *framework* bio-inspirado [79], onde o conceito de otimização não-determinística de colônia é utilizado (*Ant Colony Optimization*). Adicionalmente, supressão de ruído é obtida na abordagem proposta, assim como é esperado nas abordagens em *multi-frame*, mas com o diferencial de identificar sombras oriundas de diferentes planos (artefatos no topo da lâmina microscópica), e distribuí-los

especialmente. Exemplo desta supressão pode ser observada na ilustração da Figura 3.6, onde é possível verificar no holograma de alta-resolução a eliminação de sombras que anteriormente estavam presentes na minimização da função objetiva de custo.

Como resultado do processo de registro e otimização do conjunto de baixa-resolução, é possível obter uma única imagem com resolução  $n$  vezes maior, onde  $n$  é o fator de incremento em relação à imagem inicial, ou analogamente o fator de divisão na qual um único *pixel* na imagem será sub-dividido nas derivativas em  $x$  e  $y$ . Por fim, o holograma obtido em alta-resolução é submetido a método numéricos de difração escalar, para recuperação da informação morfológica no plano-objeto.

### 3.1.2.1 Registro das Imagens Holográficas

O processo de registro (ou alinhamento) de imagens consiste na computação de uma transformação ótima entre dois ou mais planos, com o objetivo de alinhá-los no mesmo domínio planar. As primeiras técnicas para o alinhamento de imagens foram propostas a três décadas, através do algoritmo seminal de Lucas e Kanade [80]. Nesta abordagem, Lucas e Kanade propuseram um método baseado na informação de intensidade do gradiente da imagem, na busca pelas melhores correlações entre dois planos de entrada. O algoritmo original sofreu diversas modificações e adaptações tal como apresentado por [81, 82, 83, 84], mas no entanto, a ideia original do algoritmo de Lucas e Kanade é uma das mais utilizadas na visão computacional para o rastreamento de objetos em vídeo, análise de movimento, e reconhecimento de padrões.

É possível também verificar que o processo de registro pode ser realizado tanto por métodos baseados em correspondência de *pixel*/área, como por correspondência de características [85, 86, 87, 88]. Métodos por correspondência de *pixel*/área (*area-matching*) computam transformações na imagem candidata ( $C$ ) para registrá-la em uma imagem de referência ( $R$ ) tomando por base um valor de erro a ser minimizado, computado a partir das diferenças entre os planos  $C$  e  $R$ . Em geral, métodos baseados em correspondência de área apresentam um elevado custo computacional para realizar as diversas transformações devido comparações *pixel-a-pixel*. Métodos por correspondência de características

(*feature-based*), por sua vez, utilizam um conjunto esparsos de pontos comuns entre  $C$  e  $R$ . A premissa básica é localizar pontos de interesse em ambas as imagens (denominados de *key-points*), e correlacioná-los para a computação de uma matriz global de transformações para as imagens (denominada de matriz de homografia). Embora não apresentem a mesma eficiência em termos de resultados qualitativos, métodos de registro baseados em características são bastante eficientes em tempo de execução.

Na metodologia holográfica proposta, o conjunto de imagens em baixa-resolução é obtido a partir de pequenas variações de posicionamento da fonte de luz, assim como a aquisição dos hologramas é realizado com o mesmo feixe de comprimento de onda, intensidade e condições de distância e foco. Sob tais circunstâncias o conteúdo da cena é quase o mesmo e a cena é aproximadamente planar. Desta maneira, uma abordagem híbrida é utilizada na metodologia proposta para realizar inicialmente o alinhamento rápido das imagens holográficas (com base nas características), seguido pela otimização de um método baseado em correspondência de *pixel*/área.

O alinhamento rápido das imagens holográficas baseado em características é realizado através de uma transformação global na imagem  $C$  em relação a  $R$ . Operações de deformação em  $C$  são realizadas tomando por base um conjunto de operações permitidas sendo rotações rígidas *in-plane* e operações de translação nas direções  $x$  e  $y$ . Para este conjunto de deformações, uma matriz de transformações é obtida a qual depende essencialmente dos parâmetros do vetor  $p = (w_z, t_x, t_y)$ , sendo  $w_z$  o componente de rotação e  $t_x$  e  $t_y$  as componentes de translação nos planos  $x$  e  $y$ , respectivamente. É possível ainda na definição da matriz de transformações acima, pela generalização de  $W$ , realizar deformações mais complexas tal como transformadas nos planos 3D e operações em escala, as quais não se aplicam para o contexto holográfico apresentado.

Para a obtenção de  $W$ , uma série de algoritmos comumente utilizados na literatura para o registro baseado em características são utilizados. Estes algoritmos podem ser sumarizados em detecção dos *key-points* em  $C$  e  $R$ , e com base nos pares comuns de *key-points* em ambas as imagens, uma matriz de homografia é computada para registro das imagens no mesmo domínio planar (2D). Estes procedimentos com os respectivos

algoritmos computacionais são descritos abaixo:

1. Uma das imagens é utilizada como imagem referência ( $R$ ) para o registro de todo o conjunto de imagens em baixa-resolução, onde a imagem localizada ao centro do deslocamento é utilizada para manter uma distância aproximada entre todos os pontos, e consequentemente menor interferência geométrica;
2. Os *key-points* são detectados para todas as imagens candidatas ( $C$ ) e também para  $R$ . Para localização dos *key-points* o descritor de SURF (*Speeded Up Robust Features*) [89, 90] é utilizado, sendo este um robusto detector local de características. O detector de SURF é um descritor de alta-performance dos pontos de interesse em uma imagem, onde a imagem é transformada em coordenadas utilizando uma técnica denominada de multi-resolução. Esta técnica consiste em reduzir a largura de banda de uma imagem de entrada (mas mantendo o tamanho original) utilizando um modelo piramidal Gaussiano ou Laplaciano, obtendo assim a informação de espaço-escala. Embora na abordagem proposta não exista problema de escala, o algoritmo SURF é invariante à informação de escala graças ao seu modelo piramidal. O algoritmo SURF é baseado no seu antecessor SIFT (*Scale-Invariant Feature Transform*) [90], mas provendo resultados melhores e com menor complexidade computacional;
3. Vetores de características são obtidos a partir dos *key-points* para  $C$  e  $R$ . O algoritmo FLANN (*Fast Approximate Nearest Neighbor*) [91, 92] é utilizado para este propósito para realizar a correlação dos vetores. FLANN apresenta como princípio de trabalho realizar buscas de caráter *nearest neighbor* em espaços de alta ordem dimensional;
4. Uma etapa adicional de filtragem é realizada para eliminar vetores de características que podem ser considerados *outliers*. A premissa básica desta eliminação é que a grande maioria dos vetores apresentem o mesmo comprimento de deslocamento com o mesmo ângulo de orientação. Através de uma abordagem de mínimos quadrados, uma métrica simples de clusterização classifica os vetores com características coincidentes, eliminando as distâncias e coeficientes angulares não correspondentes ao

alinhamento dos hologramas;

5. A matriz de homografia é computada pelo método RANSAC (Random Sample Consensus) [93, 90], um modelo estocástico iterativo que tenta diferentes sub-conjuntos randômicos a partir dos pares correspondentes, para estimar a matriz de transformações. O método RANSAC é utilizado em modelos matemáticos para a estimativa de parâmetros em um conjunto de dados observados na presença de pontos *outliers*. Por ser de natureza estocástica, o algoritmo é não-determinístico e produz resultados aceitáveis com uma certa probabilidade, que incrementa conforme mais iterações são utilizadas. A premissa básica de funcionamento é que o dado consiste de pontos *inliers*, que podem ser verificados através de uma distribuição que pode ser modelada através de um conjunto de parâmetros. Para cada conjunto de vetores de características, uma matriz global de homografia é computada correspondendo às transformações para alinhamento de  $C$  em  $R$ . O melhor sub-conjunto de pontos com correspondência é então utilizado para produzir uma estimativa inicial da matriz de homografia.

Na ilustração da Figura 3.7 é demonstrado o processo de alinhamento realizado sob as imagens de baixa-resolução, através do processo anteriormente descrito para correlação dos *key-points*. Para a Figura 3.7-(a) e (b), hologramas de baixa-resolução correspondendo aos índices de número 2 e 48 são apresentados (dentro um conjunto total de 49 imagens). Ao lado esquerdo a imagem de referência  $R$  é apresentada, enquanto que ao lado direito a imagem holográfica  $C$ , candidata ao registro, é demonstrada. Em ambas as imagens é possível verificar os *key-points*, onde as linhas conectando ambas as imagens  $R$  e  $C$  indicam os vetores de características encontrados. Na região em destaque ao centro de cada imagem, as linhas em vermelho indicam o ângulo de orientação e o traço correspondente para cada vetor de deslocamento dos *key-points* após mapeados. Através dos vetores de características, matrizes de homografia correspondendo às transformações globais são obtidas para cada imagem do conjunto de baixa-resolução.

Outra observação interessante para avaliação da efetividade da matriz de homografia obtida é através da verificação da diferença que dois planos quaisquer apresentam após

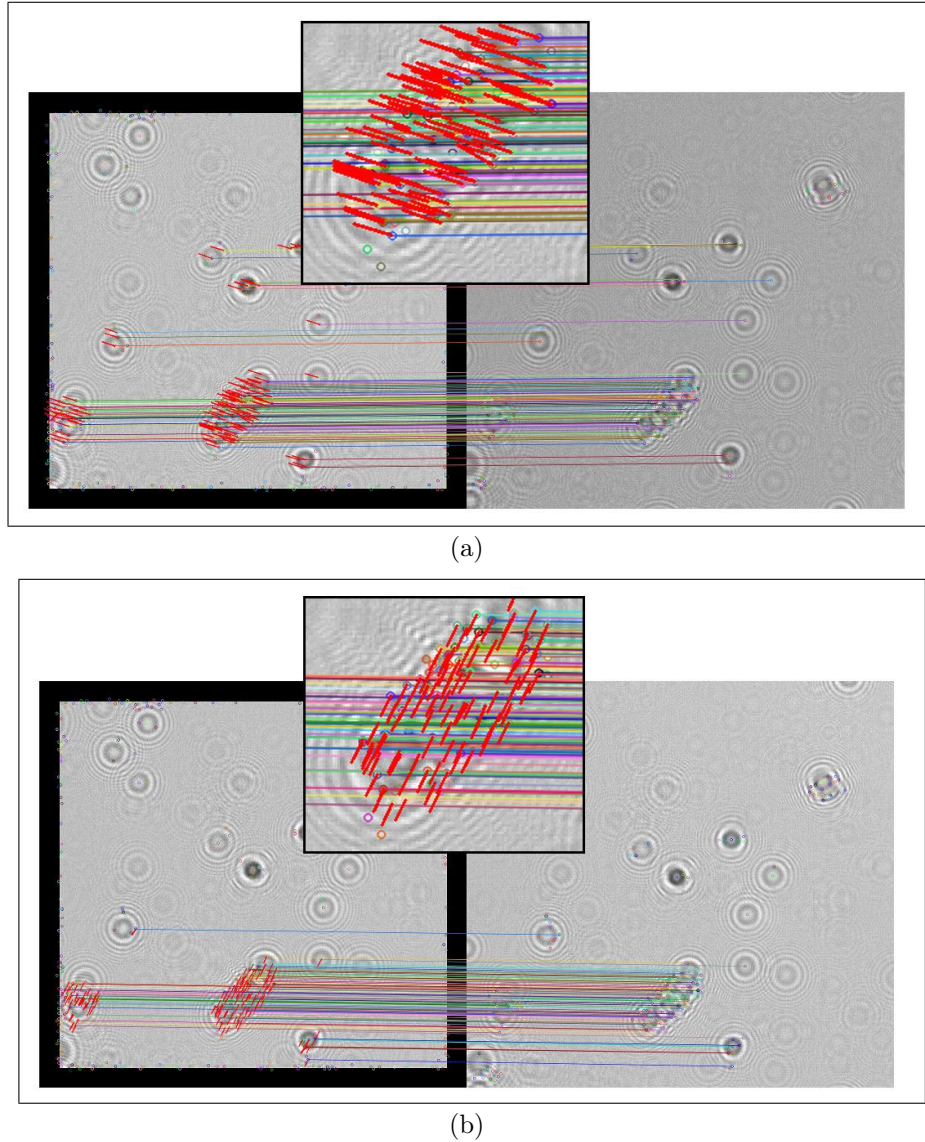


Figura 3.7: Registro do holograma de referência (esquerda) com hologramas candidatos (direita). Região em destaque corresponde ao deslocamento dos vetores de característica.

serem alinhados, conforme pode ser verificado através da Figura 3.8. Em (a) é apresentada a diferença entre os planos  $R$  e  $C$ , sem a realização do registro inicial. Em (b) é demonstrada a mesma operação de diferença realizada com o mesmo plano candidato  $C$  transformado pela matriz de homografia, e subtraído de  $R$ . Pode-se verificar que uma série de hologramas realizaram a correspondência, enquanto que nesta etapa já é possível identificar assinaturas holográficas que se encontram em diferentes planos de difração, tal como apresentado pelo holograma principal na figura em (b). Outro aspecto interessante é a computação de um mapa global de deslocamento, na qual todas as imagens do conjunto de baixa-resolução se encontram em relação à  $R$ . Pela computação de um vetor global

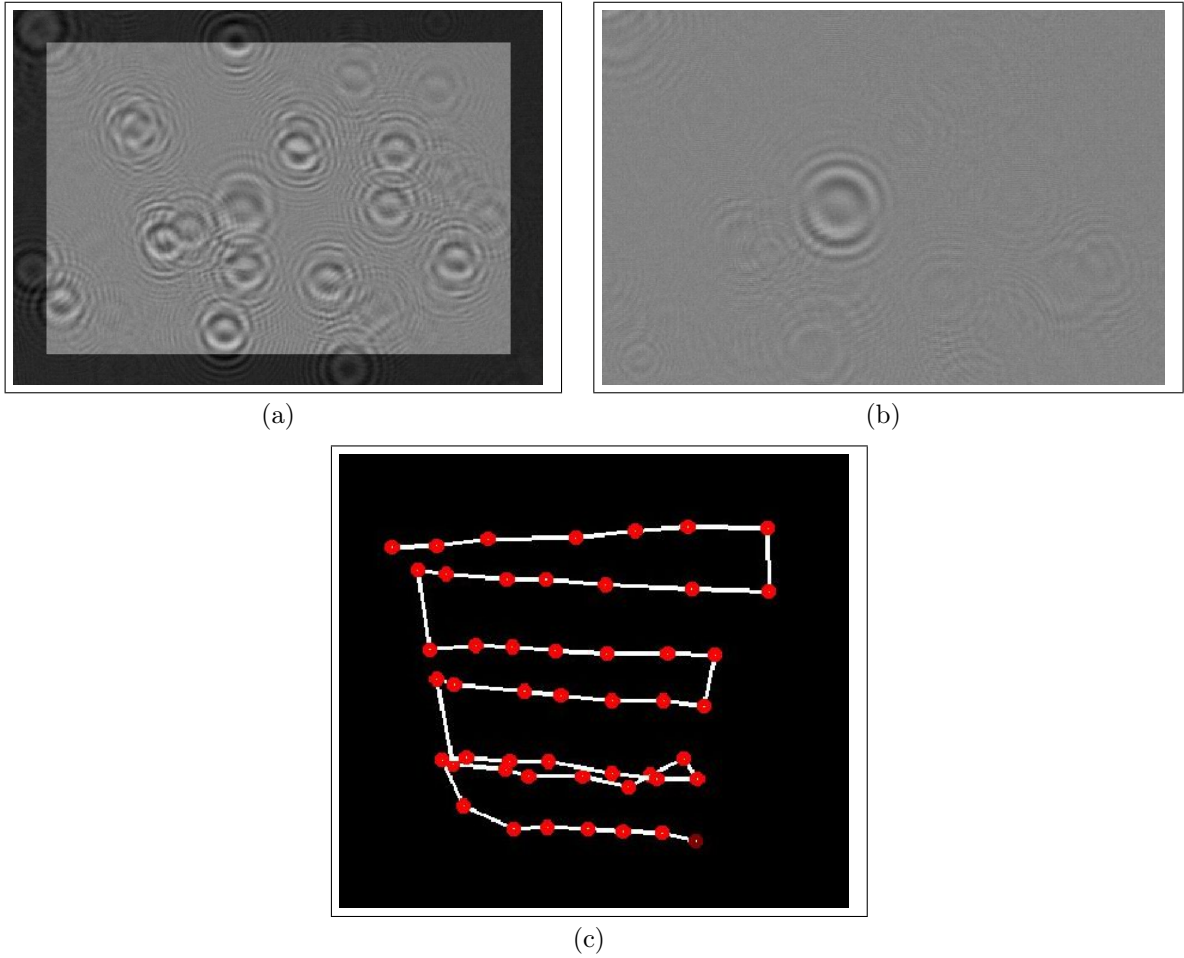


Figura 3.8: Resultado do método de registro inicial utilizado na abordagem proposta. Em (a) exemplo da diferença de uma imagem  $C$  em relação a  $R$ . Em (b) diferença de *pixels* pós-registro. Em (c), mapa de deslocamento do sistema de iluminação para todo o conjunto de baixa-resolução.

de deslocamento para cada imagem  $C$  do conjunto de baixa-resolução, o mapa global de deslocamento é obtido conforme ilustrado na Figura 3.8-(c). Este mapa sumariza como ocorreram os deslocamentos da fonte de iluminação da plataforma durante o processo de aquisição das assinaturas holográficas, através de suas posições relativas.

A partir das matrizes de homografia, um registro direto das imagens de baixa resolução poderia ser utilizado para a computação de uma imagem com maior número de *pixels*. Por outro lado, métodos baseados em características não são especificamente designados para a computação da informação de *sub-pixel*. O alinhamento produzido por métodos baseados em características é baseado em *key-points* locais, caracterizando-se um alinhamento aproximado. O registro inicial, por outro lado, pode ser utilizado como



ponto de partida de um processo de registro por correspondência de área da solução com ótimo global. Isto é realizado através da minimização de uma equação energia funcional, detalhada na próxima subseção.

### 3.1.2.2 Modelos Variacionais para Minimização de Energia

Imagens são representações geralmente bi-dimensionais, onde cada posição  $\mathbb{R}^2$  pode ser referenciada de forma vetorial em tuplas ordenadas correspondendo assim a uma entidade complexa, sem senso organizacional e sem qualquer informação semântica [94]. Imagens também podem ser referenciadas como funções de  $\mathbb{R}^2$ , e neste caso muitos problemas a respeito da interpretação de imagens podem ser reformulados como:

- (a) evolução na imagem: a imagem de entrada  $I$  é considerada uma condição inicial, e equações diferenciais parciais (PDE) são aplicadas sobre estas de modo a evoluir os dados da imagem para a resolução de um problema;
- (b) minimização de uma energia por modelos variacionais: a solução dos problemas são formulados em termos de suposições de um fenômeno/modelo, o quais integram uma energia funcional que deve ser minimizada.

Para o primeiro caso, tipicamente modelos que operam sobre a evolução na imagem são de natureza iterativos, tal como o processo de difusão anisotrópico para suavização de uma imagem. Para a segunda categoria, há uma equação de energia funcional que representa todo o problema e sua solução, e esta funcional deve ser minimamente satisfeita e minimizada.

Sob um ponto de vista geral, a grande vantagem dos modelos variacionais sobre os demais modelos é que uma grande quantidade de dados discretos (*pixels*) são reduzidos para uma única função contínua. O cálculo das variações (de onde surge o termo variacional) originou-se de fatos triviais e bem conhecidos, tal como o problema do menor caminho entre dois pontos, que é uma linha reta; ou tal como o círculo é a figura com a maior área inclusa dentro de um dado perímetro. O cálculo variacional preocupa-se com o extremo de uma dada funcional – uma função de funções –, pois esta procura encontrar um ca-

minho, curva ou superfície, de modo que uma funcional possa apresentar um mínimo ou máximo. Em um senso matemático, um modelo variacional envolve encontrar funções  $u$  desconhecidas na forma de integrais funcionais. Em modelos variacionais é fácil realizar uma leitura de todo o problema em uma simples fórmula de energia funcional.

Um modelo variacional é uma abordagem baseada em equações diferenciais parciais que possibilitam modelar as propriedades  $A_1, \dots, A_n$  de um modelo qualquer através de uma energia funcional  $E$

$$E(u_1(x), \dots, u_n(x)) = \int_{\Omega} (A_1 + \dots + A_n) dx. \quad (3.1)$$

A energia funcional  $E$  tenta encontrar as funções  $u_1, \dots, u_n$  que consigam minimizar a energia, em geral em função de condições especiais que são colocadas [21], chamadas aqui simplesmente de “suposições”. Este tipo de abordagem apresenta uma série de vantagens, tal como a simplicidade na formulação do modelo, uma vez que cada suposição  $A$  é definida através de termos penalizadores. Termos penalizadores possuem a função de indicar a qualidade de aproximação da formulação em relação ao problema: cada termo induz a grandes valores de energia quando as suposições não são satisfeitas, e em contrapartida baixos valores quando há coerência com a suposição [23, 52, 51]. Pela soma dos termos penalizadores  $A_1 + \dots + A_n$ , obtém-se o valor final da energia  $E$ : quanto menor o valor, melhor é a qualidade da aproximação de  $u$  em relação às suposições, e por conseguinte melhor a formalização do modelo. Em termos de energia funcional pode-se reformular problemas genéricos bastante complexos, e as maneiras restritivas de se modelar as suposições  $A$  tornam os modelos variacionais bastante flexíveis. Devido a generalidade, métodos variacionais podem ser aplicados com bastante eficiência em inúmeras tarefas do processamento de imagens (tal como o registro de imagens), de modo que outras técnicas de processamento de imagens não são adequadas para tratar o problema [21].

Embora apresente um conceito bastante interessante, em um modelo variacional existe a dificuldade em como formalizar analiticamente um modelo matemático para determinada suposição. Em outras palavras, a escolha de como modelar os termos penalizadores desempenha um papel fundamental em um modelo variacional. Por outro lado, mode-

los variacionais possuem a sua base construída sobre modelos matemáticos e numéricos bem fundamentados, de modo que a teoria do cálculo variacional apresenta maneiras de minimizar os termos penalizadores de uma energia funcional. Em suma, o processo de minimização de energia acaba sendo direcionado para um sistema linear de equações que necessitam ser minimamente satisfeitas, as chamadas equações de Euler-Lagrange (EL).

Como exemplo, um modelo variacional bastante simplificado é o modelo variacional para redução de ruído em uma imagem. Trata-se de um modelo variacional com penalizadores quadráticos composto de 2 suposições:

$$E(u) = \int_{\Omega} ((u - I)^2 + \alpha |\nabla u|^2) dx. \quad (3.2)$$

A primeira suposição da equação é dada por  $(u - I)^2$  é chamado de *data-term*, o qual penaliza as diferenças de  $u$  em relação a imagem  $I$ . O segundo termo  $|\nabla u|^2$ , chamado de *smoothness-term* penaliza caso haja muitas diferenças de suavidade na região. Como interpretação, é possível afirmar que a funcional restringe que o resultado  $u$  seja semelhante à entrada  $I$ , e o resultado obtido deve ser suave e não variar muito. O escalar  $\alpha$  atua como termo regularizador, controlando a importância do termo de suavidade em relação ao termo de fidelidade.

Para demonstrar a simplicidade dos modelos variacionais, uma outra variante do modelo anteriormente descrito é com o uso de termos penalizadores não-quadráticos. Como resultado, esta funcional aceita com maior eventualidade resultados finais com descontinuidades:

$$E(u) = \int_{\Omega} ((u - I)^2 + 2\alpha |\nabla u|) dx \quad (3.3)$$

uma vez que descontinuidades apresentam menor valor de penalização para  $2x$  em relação à  $x^2$ , descrito na Equação 3.2.

É possível observar outro aspecto nas equações de energia funcional anteriormente apresentadas: as mesmas podem ser facilmente generalizadas para o problema da segmentação: um segmento deve ser semelhante à sua partição em  $I$ , e o segmento não deve variar muito internamente. A principal diferença entre o uso da funcional apresentada na

Equação 3.2 para o propósito de redução de ruído e geração de segmentos é a forma na qual esta será traduzida da sua forma contínua para discreta. O que pode ser verificado é que a minimização da energia  $E$  é um compromisso entre ambos os termos penalizadores da equação.

Um exemplo bastante interessante de energia funcional é a equação de *Mumford-Shah* proposta em 1989 por David Mumford e Jayant Shah [95]. Baseado nas equações de energia para a redução de ruído descrita na Equação 3.2, *Mumford-Shah* combinaram a aproximação suave de segmentos  $\Omega$  ao mesmo tempo separados por um conjunto mínimo de fronteiras qualitativas  $K$ , mas ficaram renomados em 89 com a ideia de uso destas fronteiras para os segmentos não-suaves [96]. Através de  $\Omega = K + \bigcup_i \Omega_i$ , ou seja, todos os segmentos de um domínio planar separados por fronteiras entre os segmentos, a equação de energia funcional  $E(u, K)$  é dada por

$$E(u, K) = \beta \int_{\Omega} (u - I)^2 + \alpha \int_{\Omega/K} |\nabla u|^2 dx + \lambda \int_K d\sigma \quad (3.4)$$

de modo que  $u$  é uma função *piecewise*<sup>1</sup>. Desta forma, a interpretação dos termos desta funcional pode ser dado por:

- $(u - I)^2$  – *data-term*, o qual força a aproximação do resultado  $u$  para a imagem de entrada  $I$ ;
- $|\nabla u|^2$  – computa e controla a suavidade interna de  $u$  em sub-conjuntos disjuntos abertos e conectados  $\Omega_i$  de  $\Omega/K$  ( $\Omega$  sem as fronteiras qualitativas  $K$ ) em  $\mathbb{R}^2$ . Assim como nas equações anteriores, o objetivo deste termo é penalizar a energia quando um segmento  $\Omega_i$  apresente muita variação interna;
- o último termo regulariza o comprimento, suavidade, e locação das fronteiras  $K$ .

Similarmente, os coeficientes  $\beta$ ,  $\alpha$  e  $\lambda$  são escalares positivos os quais possibilitam ao modelo de *Mumford-Shah* ser uma abordagem em multi-escala [97]:  $\beta$  controla a aproximação de  $I$  por  $u$ , referindo-se à escala;  $\alpha$  é o termo regularizador da importância do

---

<sup>1</sup>função aplicável em cada peça  $\Omega_i$ , mas não aplicável a todo o domínio.

penalizador de suavidade;  $\lambda$  é um parâmetro de regularização de contraste para controle do comprimento das fronteiras no senso uni-dimensional de *Hausdorff* [98], limitando o tamanho total do arco de borda da segmentação  $\Omega$ . Como resultado, o coeficiente  $\lambda$  quando definido com um valor baixo a funcional força  $u$  a ter muitas fronteiras, e por conseguinte o efeito de super-segmentação. Do contrário, altos valores de  $\lambda$  tendem a forçar com que a soma total dos arcos de borda seja minimizado, e o resultado será de sub-segmentação.

### 3.1.2.3 Algoritmo para Minimização da Função Custo

A minimização de um valor de energia, no entanto, requer o uso de um modelo discreto para minimizar as equações de energia representadas pelos modelos variacionais. Nesta abordagem, a otimização em nível de *sub-pixel* é realizada por um *framework* bio-inspirado especificamente designado para domínios contínuos, proposto por [79] e denominado de  $\text{ACO}_{\mathfrak{R}}$  (*Continuous Ant Colony Optimization*). Diferentemente de uma abordagem tradicional de algoritmo de ACO, projetado para ser uma meta-heurística para problemas combinatoriais discretos, o  $\text{ACO}_{\mathfrak{R}}$  é uma categoria de algoritmos para a otimização em domínio contínuo.

Tal como a formulação básica para problemas combinatórios, a otimização em domínio contínuo consiste em um espaço de busca  $S$  definido sobre um conjunto variáveis reais, de modo que uma função objetiva  $f : S \rightarrow \mathbb{R}_0^+$  deve ser minimizada para obtenção de uma solução de ótimo global.  $S$  é um conjunto contínuo de variáveis  $X_i$ ,  $i = 1, \dots, n$ , de modo que este conjunto pode apresentar suas variáveis restritas ou não-restritas, *i.e.*,  $v_i \in D$ . Uma solução  $s^* \in S$  é a melhor configuração de um conjunto de variáveis contínuas, sendo considerada o ponto de ótimo global se e somente se  $f(s^*) \leq f(s)$  para cada possível solução  $f(s) \in S$ . O conjunto de todas as soluções global ótimo é denotado por meio de  $S^* \subseteq S$ , onde pelo menos uma  $s^*$  deve ser encontrada para solucionar o problema de otimização contínuo.

A essência do algoritmo tradicional de ACO é realizar uma construção incremental de soluções baseado na escolha probabilística de soluções componentes, com base no con-

ceito de feromônio [79]. Feromônio é utilizado para indicar sobre as soluções previamente visitadas em  $S$  as que apresentam o melhor valor de qualidade, e esta informação pode ser repassada para outros indivíduos do conjunto para realizar a visita em soluções na vizinhança. Então, o algoritmo de ACO apresenta suas variáveis definidas pela própria formulação do problema, e a cada passo da construção, um indivíduo realiza uma escolha probabilística das soluções componentes, realizando uma distribuição probabilística discreta. A ideia fundamental para a otimização em domínios contínuos adotada no algoritmo de  $ACO_{\mathfrak{R}}$  é o uso de uma função Gaussiana de densidade probabilística, onde ao invés de selecionar um componente discreto, um indivíduo amostra a função de densidade. A função de densidade no  $ACO_{\mathfrak{R}}$  é associada com uma função de distribuição cumulativa, utilizada para produzir números reais uniformemente distribuídos. Para prevenir o problema de áreas desconexas no espaço de busca, a função Gaussiana de probabilidade é baseada em uma função de kernel Gaussiana, computada através da soma ponderada de várias funções Gaussianas uni-dimensionais. Uma das grandes vantagens da utilização de várias funções de kernel Gaussiano está relacionada ao fato da dimensionalidade, onde uma única função de probabilidade Gaussiana possibilita a fácil amostragem e flexibilidade quando comparada com várias funções Gaussianas simples.

A representação do feromônio (ou modelo de feromônio) é utilizada para probabilisticamente amostrar  $S$ , e sua atualização tem como objetivo incrementar ou decrementar os valores associados com soluções boas/promissoras das soluções ruins, respectivamente. Para evitar a rápida convergência e consequentemente reduzir a busca por outras soluções promissoras, a evaporação do feromônio é utilizada, onde boas soluções previamente encontradas são utilizadas para incrementar a probabilidade da busca. Para domínios discretos, o algoritmo de ACO apresenta a informação de feromônio armazenada como uma tabela e um indivíduo utiliza esta tabela como referência para uma distribuição probabilística discreta.

Por outro lado, para domínios contínuos, a informação de feromônio não pode ser representada como uma simples tabela uma vez que a escolha não é restrita para um conjunto finito de valores. Para solucionar esta limitação, a estratégia adotada é a atualização

do feromônio baseado nas boas soluções encontradas (assim como no ACO tradicional), mas ao invés de descartar as soluções atuais encontradas pelos indivíduos, o algoritmo de  $ACO_{\mathfrak{R}}$  mantém o rastreo de um certo número de soluções, e a evaporação do feromônio é associada com as soluções mais antigas em um arquivo  $T$ .  $ACO_{\mathfrak{R}}$  armazena em  $T$  os valores correspondentes a suas  $n$  variáveis, associadas com a resposta da função objetiva  $f(s_n)$ . Diferentemente de uma abordagem tradicional de ACO ou ACO baseado em população, onde as soluções são utilizadas para atualizar o feromônio, para o caso contínuo o feromônio é utilizado para gerar dinamicamente funções probabilísticas de densidade [79].

A partir desse ponto de vista, o algoritmo de  $ACO_{\mathfrak{R}}$  é denotado como um excelente *framework* para a convergência e otimização de variáveis contínuas, bastante adequado para minimização de uma função objetiva de custo. De maneira similar, modelos variacionais apresentam a minimização de um modelo de energia, postulado como um conjunto de premissas necessárias para solucionar um problema. Pela minimização da energia, *i.e.*,  $E \rightarrow 0$ , melhor é a aproximação do modelo, onde cada premissa deve ser minimamente satisfeita. Conforme apresentado anteriormente, as premissas são modeladas por meio de termos penalizadores do modelo, onde o conceito de minimização de energia é aplicado com sucesso em muitas áreas do processamento de imagens tal como o problema da segmentação, filtragem e restauração, *denoising* [21], e também para a super-resolução em sequências de vídeo [99, 100, 101].

Nesta abordagem holográfica proposta, a minimização de uma função custo baseada em um modelo variacional para a otimização em nível de sub-pixel é utilizada. Os termos penalizadores semelhantes ao modelo de *Mumford-Shah* são utilizados com base nas premissas de alinhamento geral das imagens, e incremento da propagação das respostas de alta-frequência do sinal holográfico. A modelagem destas premissas é realizada em dois termos penalizadores distintos: termo de fidelidade, e medição do nível de *sharpness* do holograma. O primeiro termo mede a fidelidade do alinhamento entre o conjunto de baixa-resolução em relação a um resultado candidato de alta-resolução  $I$ , expressando a premissa de que o resultado deve ser conciso em proximidade de alinhamento durante a

minimização. O segundo termo é uma medida de *sharpness* designada a indicar quando uma solução candidata apresenta melhor nível de propagação do sinal holográfico.

Desta forma, considerando uma solução candidata  $I$  qualquer, contendo as transformações homográficas necessárias sobre um conjunto de baixa-resolução. A energia  $E$  desta solução candidata pode ser expressa por meio de:

$$E(I, L) = \alpha \sum_{i=1}^m (L_i - I)^2 + \beta(\nabla I), \quad (3.5)$$

onde  $L$  é o conjunto das observações em baixa-resolução transformadas, e  $m$  é a cardinalidade de  $L$ . Pode ser observado que a formulação acima mencionada é similar ao conceito geral de super-resolução proposto por [99], mas com a adição do termo de medida de *sharpness*, importante para o contexto da holografia. O primeiro termo é o termo de fidelidade utilizado para mensurar a qualidade de aproximação da imagem em alta-resolução  $I$  produzida, em relação ao conjunto de baixa-resolução, relacionada com a localidade espacial, penalizando soluções com baixa correspondência de alinhamento. Outro fator é que com a utilização de penalizadores quadráticos, a solução  $I$  é obrigada a estar próxima do alinhamento inicial realizado pela etapa de registro baseado em características. O segundo termo  $\nabla I$  é uma medida de foco computada a partir do método LAPM (*sum-modified-Laplacian*) [102]. Este algoritmo é um simples método de gradiente baseado em duas derivativas parciais utilizadas para medição de intensidades e estimar o nível de *sharpness* de uma imagem.

Os parâmetros  $\alpha$  e  $\beta$ , assim como em muitos modelos variacionais formulados na literatura, são utilizados para controlar a importância relativa de cada termo penalizador [21]. Como o conjunto de baixa-resolução é obtido sob deslocamentos espaciais, os padrões de difração podem mudar a sua forma de acordo com o posicionamento da fonte de luz (Seção 2.1.2), e os padrões de interferências holográficas podem ser distintos em imagens no conjunto. Para valores de  $\alpha = 0$ , a solução ótima será completamente dependente do nível de *sharpness*, e o processo de registro pode apresentar correspondência mesmo sem coerência espacial, uma vez que o sinal holográfico é periódico e repetitivo.



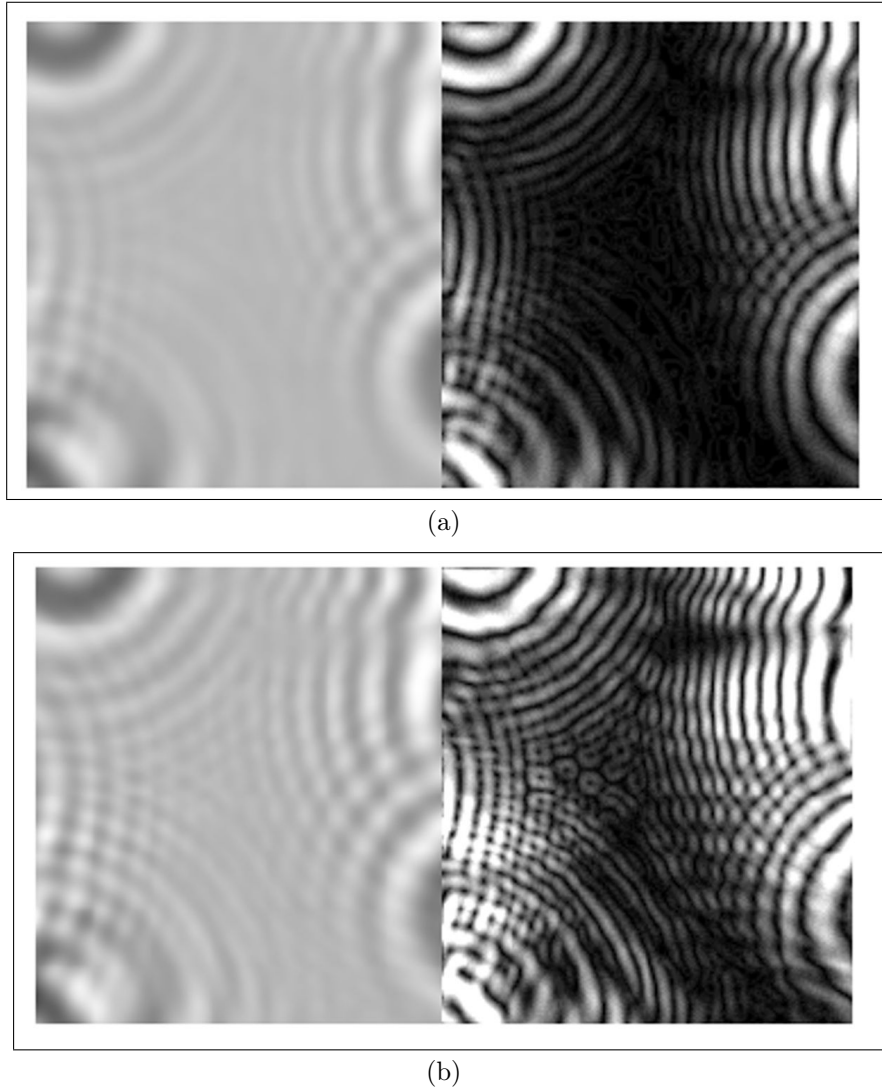


Figura 3.9: Exemplo do nível de *sharpness* para soluções candidatas distintas.

Quanto ao segundo termo, a medida de *sharpness*, é baseada na observação de que *sharpness* é indiscutivelmente o mais importante fator fotônico da qualidade em uma imagem, uma vez que juntamente com a resolução determinam o nível de detalhe que um sistema de imagem pode reproduzir [103]. Uma validação extensiva na literatura foi realizada sobre 33 métodos de medida de foco, e foi verificado que operadores baseados em Laplace apresentam a melhor performance geral sob condições normais de imageamento [103]. No entanto, é dificultoso determinar qual é o mais adequado operador, uma vez que em cenários específicos, tal como a holografia, existe uma forte dependência com a configuração do conjunto de iluminação e detector onde a sequência de imagens é capturada. Outro aspecto é que os métodos apresentados por [103] são designados para propósitos

gerais, e na literatura alguns destes métodos são extensões para o tratamento de sinais holográficos. No exemplo da Figura 3.9 diferentes níveis de *sharpness* para duas soluções candidatas são apresentadas. Na primeira coluna o holograma original é demonstrado, enquanto que na segunda coluna o gradiente do holograma computado pelo compasso de *Prewitt* é apresentado. Como pode ser observado, o nível de *sharpness* apresentado pela solução candidata da segunda linha apresenta um maior nível de detalhamento e propagação do sinal holográfico.

Para o algoritmo apresentado nesta seção, foram utilizados os seguintes parâmetros: população do ACO<sub>R</sub> é  $P = (N_{lr} - 1) * N_t$ , onde  $N_{lr}$  é o número de imagens de baixa-resolução capturadas, e  $N_t$  são as transformações da matriz de homografia. O número de *ants* é  $k = 4$ ,  $x_p = 1$ , com uma taxa de convergência igual a 0.85. O algoritmo foi executado sob um número de 200 interações.

## 3.2 Plataforma Holográfica de Microscopia para Processamento em Vídeo

Processamento em vídeo holográfico é um aspecto bastante interessante que pode ser obtido através de uma variante da plataforma holográfica anteriormente apresentada. Principalmente no que diz respeito a análise de movimentação de amostras biológicas vivas, plataformas holográficas portáteis são aplicações bastante relevantes para o imageamento *in-situ*. O termo *in-situ* refere-se à análise de amostras de micro-organismos ou celulares, de modo que o seu ambiente natural é preservado. Embora ocorra a transposição da amostra do seu meio natural para uma lâmina microscópica ou mesmo canal de micro-fluídica, o meio fluídico originário é o mesmo. Exemplo é a coleta de fluídos contidos em ambientes de água estocada, onde uma ampla variedade de espécimens microscópicos podem ser observadas. Neste caso, plataformas de microscopia holográficas sem lentes caracterizam-se como ferramentas de *Point-of-Need*, podendo ser utilizadas para propósitos gerais, tal como a observação da qualidade da água encontrada na natureza. Nas próximas subseções, a plataforma holográfica para video é demonstrada, bem como o fluxo

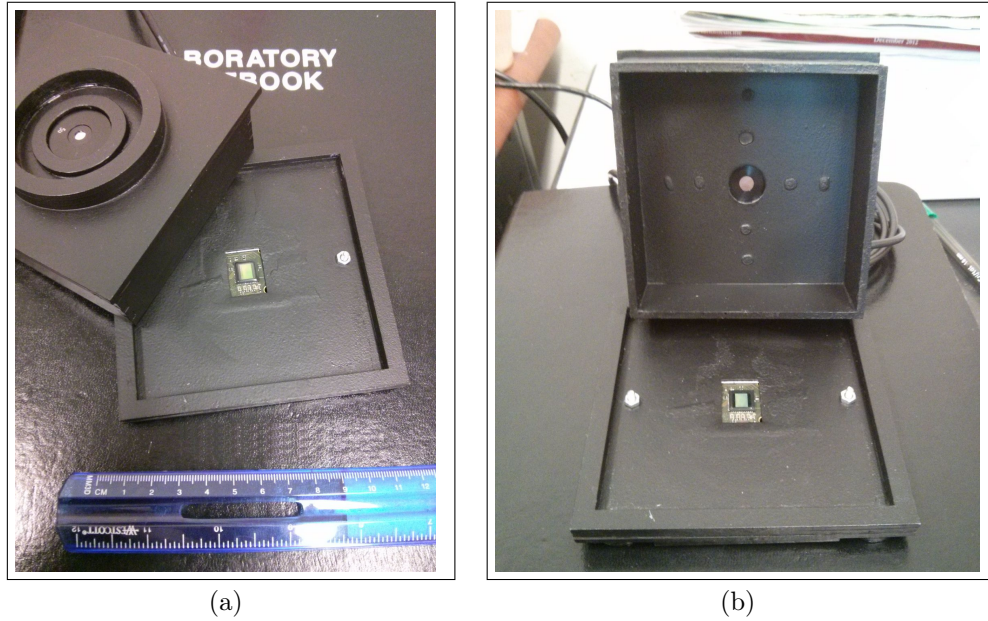


Figura 3.10: Protótipo da plataforma sem lentes desenvolvida para processamento em vídeo holográfico.

operacional para aquisição e processamento dos sinais holográficos.

### 3.2.1 Descrição Experimental do Setup

A plataforma proposta para o processamento em vídeo holográfico consiste no mesmo conceito geral de imageamento sem lentes apresentado anteriormente pela Figura 3.1. No entanto, a plataforma para vídeo holográfico difere da configuração de hardware descrita na Seção 3.1.1 em principalmente dois aspectos: (i) alta taxa de amostragem é necessária, logo a redução da FOV faz-se necessária, (ii) a fonte de iluminação é fixa, sem movimentação para melhoramento da resolução dos sinais holográficos. Por não necessitar de uma plataforma de deslocamento da fonte luminosa, o hardware pode ser miniaturizado em alguns centímetros cúbicos com altura mínima para a propagação da feixe luminoso (3 – 4 *cm*).

Na Figura 3.10 uma visão geral do protótipo da plataforma para vídeo holográfico desenvolvida é apresentada. As dimensões de base da plataforma e posicionamento do sensor são os mesmos utilizados na plataforma anteriormente descrita, diferindo principalmente no sistema de iluminação que é fixado e posicionado sob o centro do detector. O sistema de iluminação utilizado nesta versão da plataforma corresponde a um LED laser

de cor vermelha de baixo custo, uma vez que a coerência espacial e temporal do laser é relativamente alta quando comparado com outros sistemas de iluminação.

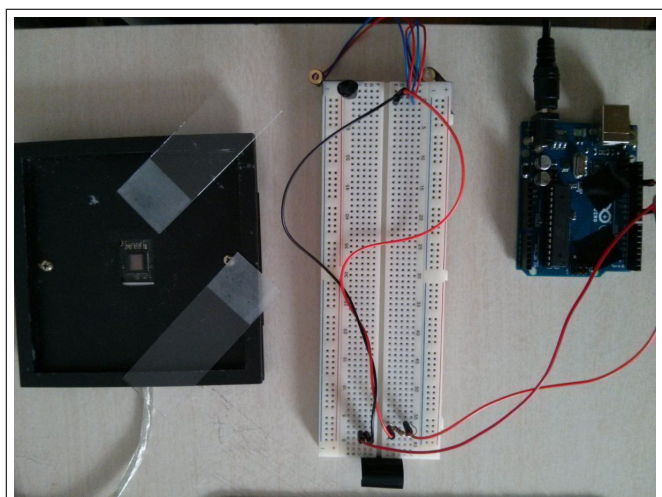
Outro aspecto é que fonte de iluminação ultra-violeta não se torna adequada para o imageamento de amostras *in-situ*. Iluminação ultra-violeta devido ao baixo comprimento de onda atua como efeito esterilizador em micro-organismos e bactérias, e sua utilização reduz a vida útil dos espécimens durante a aquisição das amostras pela plataforma. Para efeitos de prototipagem, um Arduíno UNO é utilizado para auxiliar no controle da intensidade do LED em relação a taxa de exposição do detector, e desta maneira reduzir significativamente os valores de *shutter-time* para captura em vídeo com qualidade entre quadros.

### 3.2.2 Abordagem de Processamento Holográfico em Vídeo

O processamento de vídeo holográfico apresenta algumas particularidades quanto a configuração da plataforma. Para o aspecto de captura em altas taxas de amostragem, embora o limite do detector seja entre 2.5 a 3.2 *fps* considerando toda a área ativa do sensor (3840x2748 *pixels*), pela redução da FOV para um sub-domínio específico é possível a obtenção de capturas com taxas de amostragem de até 60 *fps*. Dependendo a amostra analisada, foi verificado que capturas com taxas de amostragem em torno de 15 *fps* com uma taxa de exposição de 5-10  $\mu s$  são suficientes para gravação de vídeo holográfico com qualidade. Para amostras que movimentam-se muito rapidamente no meio fluido, capturas em torno de 35 *fps* são necessárias.

Quanto ao fluxo computacional para aquisição de vídeo holográfico, a abordagem é bastante simples e ocorre em duas etapas assíncronas distintas: (a) aquisição do vídeo holográfico dentro de uma sub-FOV e com limite de tempo variados, e (b) análise e decodificação do vídeo holográfico por métodos numéricos de difração. A sumarização destas etapas é demonstrada através da Figura 3.12, onde a plataforma de vídeo holográfico proposta é ilustrada.

Para a etapa de aquisição do vídeo holográfico, um procedimento bastante simples é adotado: amostras fluidicas são coletadas no ambiente, e posicionadas diretamente sobre o



(a)



(b)

Figura 3.11: Controle de iluminação utilizando um Arduino Uno e LED laser vermelho de baixo custo.

sensor de imagem. Para os experimentos apresentados neste documento, amostra de água comumente encontrada em ambientes residenciais internos e externos foi utilizada. Outro ambiente rico em espécimens é a água que simula um ambiente aquático tal como um aquário ornamental. Exemplo do processo de preparação da amostra para imageamento é demonstrado através da Figura 3.13, onde uma gota é acomodada sobre uma lâmina microscópica ou diretamente sobre uma cobertura fina de vidro. Uma vez posicionada sob o detector, os seguintes procedimentos são utilizados:

1. Uma inspeção inicial de todo o FOV é realizada em busca hologramas de micro-organismos em movimentação;

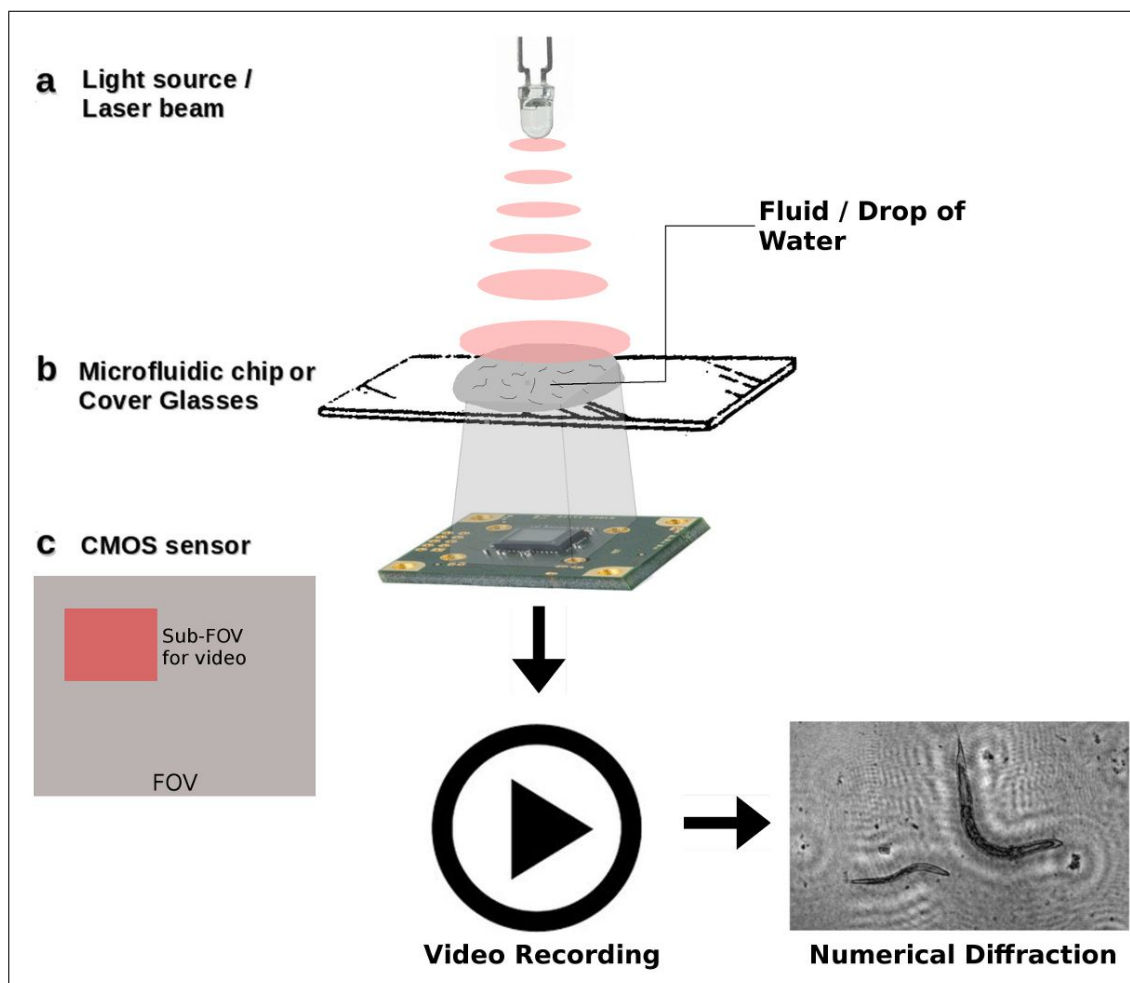


Figura 3.12: Diagrama geral da plataforma microscópica para vídeo holográfico.

2. Hologramas alvo de inspeção são então janelados e uma nova sub-FOV (ou região de interesse) é definida em torno do objeto em movimento;
3. Configurações do arquivo de saída em vídeo são definidas (formato, *fps*), bem como configurações da taxa de exposição do detector;
4. O vídeo é gravado enquanto o holograma movimenta-se na sub-FOV, não havendo uma limitação em relação ao tempo transcorrido do vídeo ou tamanho de arquivo de saída.

A etapa de decodificação consiste na escolha de uma profundidade de difração  $z$ . O método numérico de difração escalar é então aplicado a cada *frame* do vídeo independentemente, para todos os tipos de sinais do campo complexo demonstrados na Seção 3.3. *Frames* de saída são então recompostos em vídeos com as mesmas configurações do vídeo

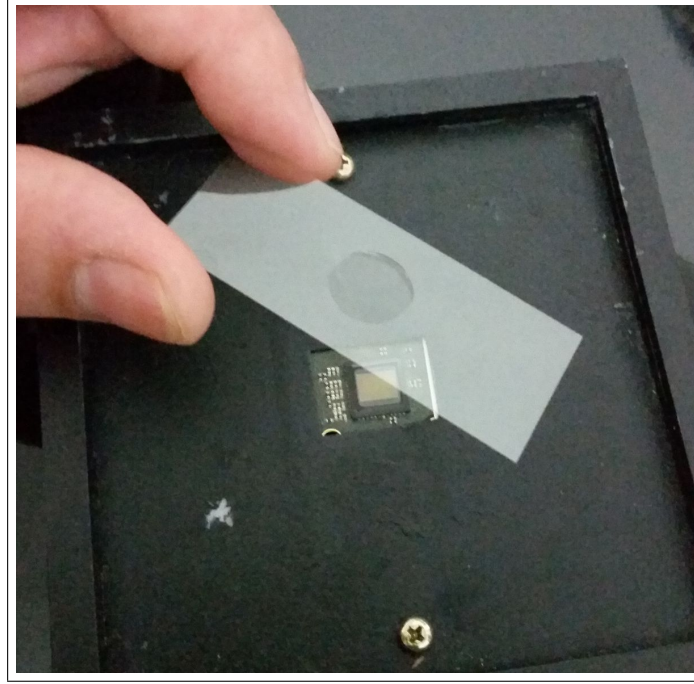


Figura 3.13: Demonstração do imageamento holográfico *in-situ* de micro-organismos existentes em uma gota de água.

de entrada.

A vantagem desta forma da aquisição assíncrona é que a análise do vídeo da amostra pode ser realizada repetitivamente em 4D (volume + tempo), com diferentes parâmetros de difração ( $z$ ) e tipos de sinais providos pelo método numérico de difração. Outro aspecto de bastante interesse e relevância é a análise e reconstrução volumétrica 4D do ambiente analisado. No entanto, reconstrução volumétrica não corresponde ao escopo atual da plataforma holográfica proposta.

### 3.3 Método Numérico para Difração Escalar

O processo de difração escalar descrito na Seção 2.1.3 pode ser discretizado através da convolução de Fresnel. A difração de Fresnel-Huygens pode ser expressa por:

$$E(x, y; z) = -\frac{ik}{2\pi z} \iint_{\Sigma_0} dx_0 dy_0 E_0(x_0, y_0) \exp \left[ ik \sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 + z^2} \right], \quad (3.6)$$



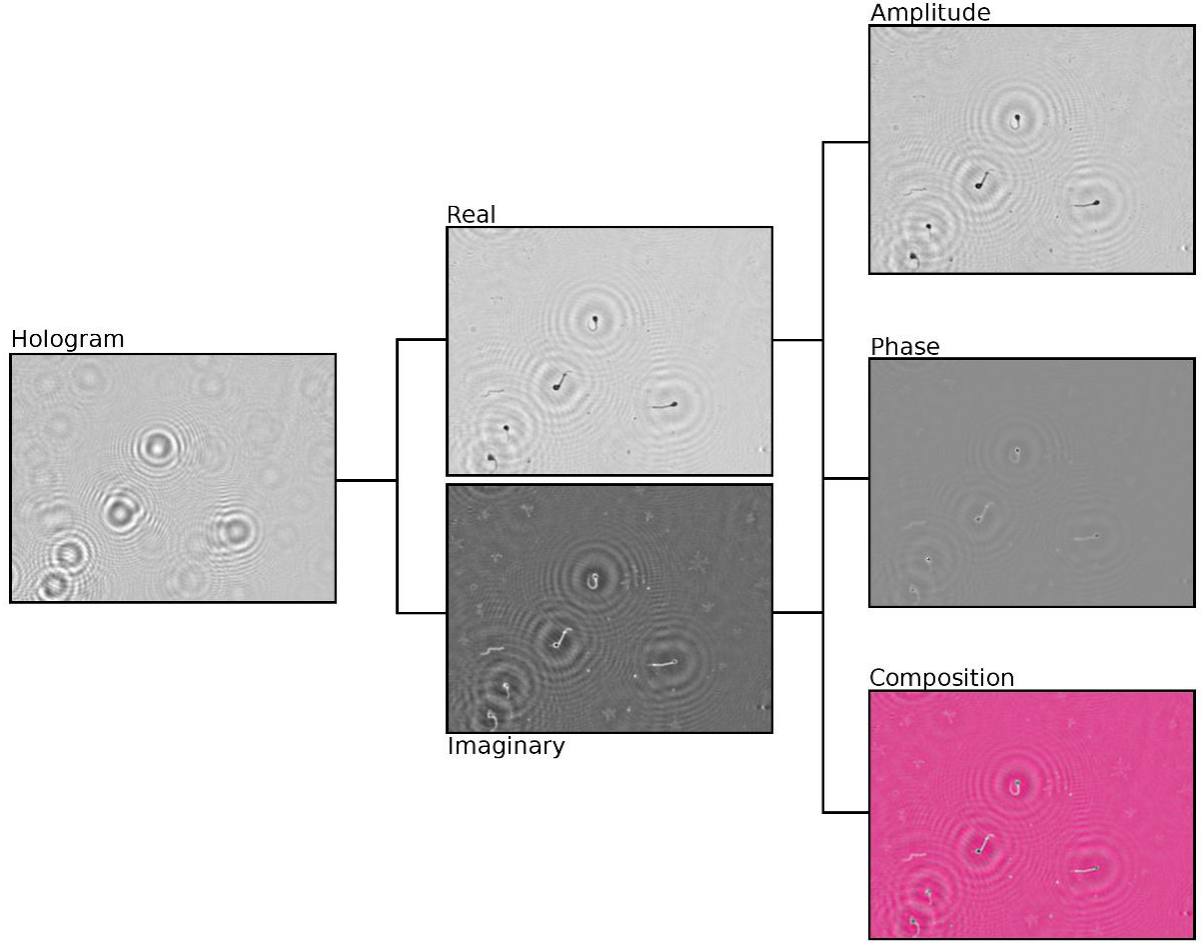


Figura 3.14: Holograma original decomposto nas parte real ( $\Re$ ) e imaginária ( $\Im$ ). A partir de  $\Re$  e  $\Im$ , fase ( $\theta$ ) a amplitude ( $r$ ) podem ser computadas. Sinal multi-dimensional pode ser obtido pela combinação dos sinais  $\Re$ ,  $\Im$ ,  $\theta$  ou  $r$ .

e pode ser reescrita de acordo com o teorema da convolução como [57]:

$$E(x, y) = \frac{\exp(i\frac{2\pi}{\lambda}z)}{i\lambda z} F^{-1}\{F\{E_0(x_0, y_0)\} \cdot F\{S_H(x_0, y_0)\}\}, \quad (3.7)$$

onde  $S_H$  é a função de resposta de impulso definida na Equação 2.3 (ou a  $PSF$ ), e  $F$  é a transformada de Fourier e sua inversa ( $F^{-1}$ ).

Na implementação numérica é necessário discretizar cada variável espacial e utilizar a transformada rápida de Fourier (FFT) conforme segue [57]: as variáveis espaciais discretizadas são  $(x_0, y_0) = (m_0\Delta x_0, n_0\Delta y_0)$ , onde  $\Delta x_0$  e  $\Delta y_0$  são os passos de amostragem (*sampling pitches*) do sensor, e  $m_0$  e  $n_0$  são índices inteiros no plano de origem (entrada), conforme representação da Figura 2.5. Semelhantemente, as variáveis espaciais discretizadas são  $(x, y) = (m\Delta x, n\Delta y)$ , onde  $\Delta x$  e  $\Delta y$  são os passos de amostragem e  $m$  e  $n$  são



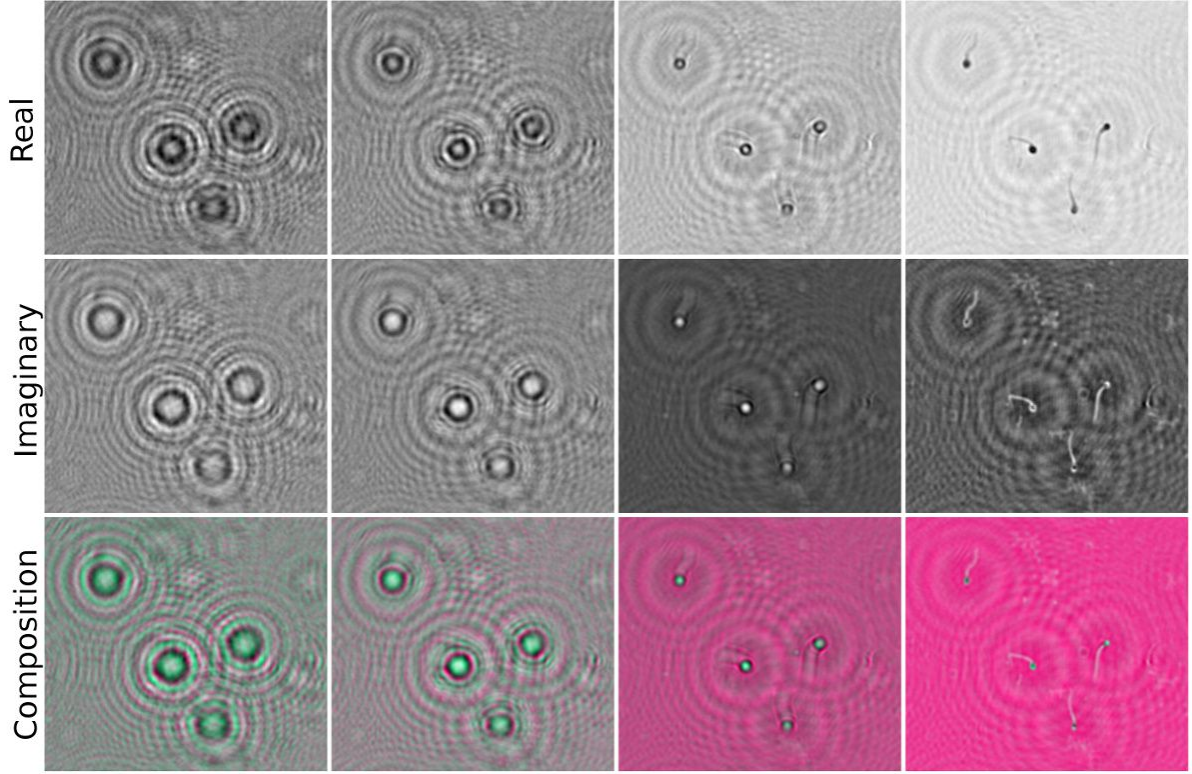


Figura 3.15: Exemplo de difração de um sinal holográfico de células reprodutoras masculinas. Da primeira para a terceira coluna é demonstrado a parte  $\Re$ ,  $\Im$  e a composição do sinal  $C$ , respectivamente. Valores de difração são  $z = 30k, 45k, 60k, \approx 70k$ .

índices inteiros no plano de destino. As faixas dos índices inteiros são determinadas pelas dimensões da imagem holográfica. Desta forma, utilizando os índices  $m_1$  e  $n_1$  a difração de Fresnel na forma de convolução pode ser denotada por:

$$E(m, n) = \frac{\exp(i\frac{2\pi}{\lambda}z)}{i\lambda z} FFT^{-1}[FFT[E(m_1, n_1)] \cdot FFT[S_H(m_1, n_1)]], \quad (3.8)$$

onde

$$S_H(m, n) = \exp(i\frac{\pi}{\lambda z}((m\Delta x_0)^2 + (n\Delta y_0)^2)). \quad (3.9)$$

Deve ser observado que a amostragem é plano de origem e plano de destino é a mesma após o processo de difração ser realizado, ou seja,  $\Delta x_0 = \Delta x$  e  $\Delta y_0 = \Delta y$ , conforme ilustrado pela Figura 2.5.

A chamada para a  $FFT$  corresponde a computação de um campo de números complexos, onde a parte real ( $\Re$ ) e imaginária ( $\Im$ ) podem ser obtidas, conforme demonstrado na Figura 3.14, onde hologramas de células reprodutoras masculinas são demonstrados.

A partir do sinal  $\Re$  e  $\Im$ , sinal de fase e amplitude pode ser computado por meio de

$$\theta(x, y) = \tan^{-1} \frac{\Im(x, y)}{\Re(x, y)}, \quad (3.10)$$

$$r(x, y) = [\Re(x, y)^2 + \Im(x, y)^2]^{1/2}, \quad (3.11)$$

respectivamente. É interessante observar que diferentes sinais podem ser melhor utilizados dependendo do tipo da amostra a ser inspecionada. Nas seções seguintes será verificado que para células reprodutoras o sinal de amplitude é bastante interessante para a visualização semelhante ao campo de luz brilhante (*bright-field*) de um microscópio óptico convencional. Sinal imaginário é interessante para pequenas estruturas tal como plaquetas, destacando o sinal semelhantemente a uma imagem de fluorescência. É possível ainda realizar a composição de sinais e uma imagem multi-dimensional, onde

$$C_{rgb} = [\Re, \Im, \Re + \Im], \quad (3.12)$$

resultando em um sinal onde o *background* tende a apresentar-se homogêneo enquanto destacam-se os demais objetos na cena, auxiliando na análise automatizada das amostras em operações de contagem ou extração de características.

Pela variação de  $z$ , respostas de difração em diferentes profundidades são dadas para cada um dos sinais anteriormente descritos. Na Figura 3.15 o processo de difração para diferentes planos-objeto é realizado para amostras de células reprodutoras masculinas. Da primeira coluna para a terceira, o sinal  $\Re$ ,  $\Im$  e  $C$  são demonstrados considerando valores de difração de  $z = 30k, 45k, 60k, \approx 70k$  ( $\Im = 68k$  e  $C = 67k$ ). Pela variabilidade de  $z$  é possível observar o efeito da difração para até que o ponto de foco seja encontrado para um determinado volume.

Este processo é equivalente ao processo de ajuste de foco de um microscópio óptico convencional. Existem algumas abordagens computacionais para o ajuste de foco automatizado em imagens de propósito geral. No entanto, para sinais holográficos, o ajuste de foco deve ser conduzido por algoritmos específicos.

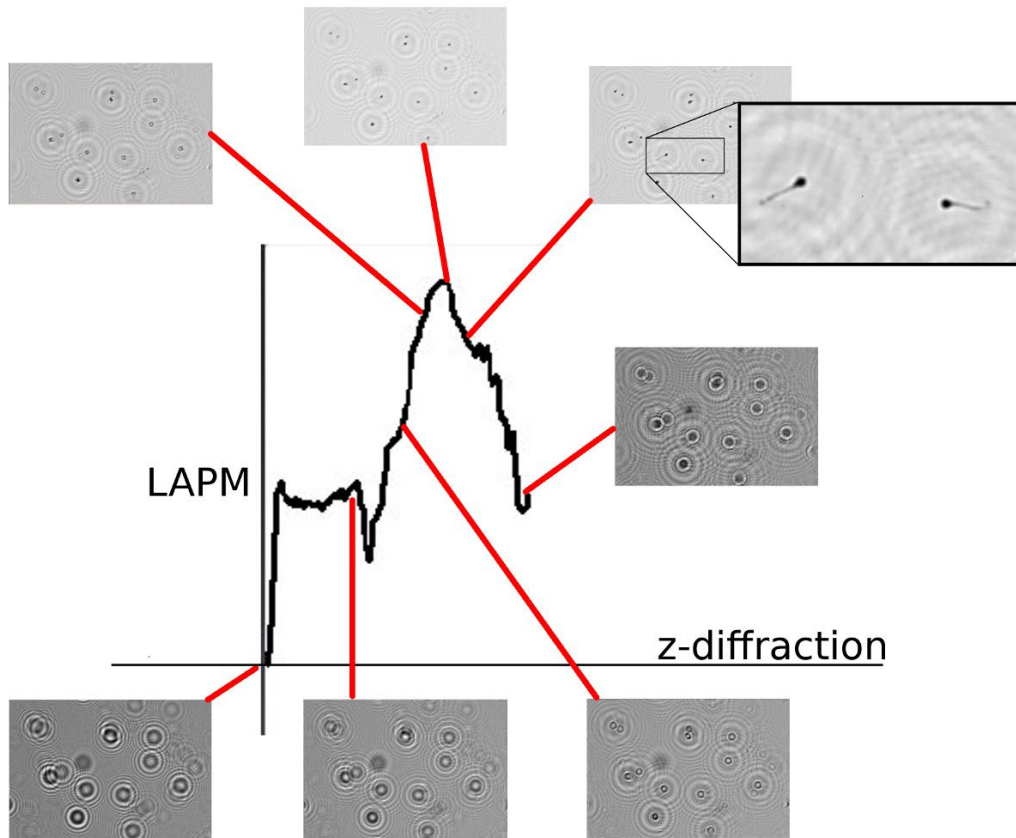


Figura 3.16: Utilização do índice LAPM como métrica para o ajuste automatizado do ponto de foco de difração em sinais holográficos.

De maneira preliminar, é possível verificar que métodos baseados em *sharpness* tal como o utilizado na etapa de otimização do sinal holográfico pode ser utilizado para quantificar o grau de gradiente de uma imagem holográfica. Desta forma é possível encontrar uma aproximação para o ajuste automatizado do ponto de foco, conforme demonstrado através da Figura 3.16, onde uma variante do método LAPM é utilizada para quantificar o valor da soma de gradientes na imagem.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção, os resultados experimentais obtidos pela plataforma holográfica proposta serão apresentados. O objetivo principal é demonstrar os resultados da holografia *inline* com o enfoque na microscopia biológica. Para tal, os resultados obtidos com o melhoramento da resolução dos hologramas através da abordagem em *multi-frame* serão discutidos, e comparados em relação a um único *frame* obtido pela plataforma. A validação e apresentação dos resultados é explorada a partir de: (i) análise dos sinais holográficos comparando os hologramas de maneira individualizada e realizando mensurações da qualidade e número de ciclos de onda; (ii) validação e análise microscópica da plataforma holográfica, considerando todas as etapas que incluem a aquisição e melhoramento da resolução, decodificação do sinal holográfico, e por fim comparação visual em relação ao padrão-ouro utilizado na microscopia, que é a imagem obtida por um microscópio óptico convencional. Amostras de células humanas reprodutoras masculinas serão utilizadas para tal propósito devido a suas características peculiares em relação aos demais tipos de amostras biológicas humanas.

Para o protótipo de holografia em vídeo, resultados experimentais serão conduzidos sem a validação microscópica. A correlação exata de espécimens em vídeo *in-situ* é complexa de ser realizada devido a movimentação das partículas, não havendo desta forma uma completa correlação do posicionamento da imagem holográfica com a imagem microscópica. Outro fator é que o desenvolvimento da plataforma holográfica para processamento de microscopia em vídeo ocorreu a posteriori do período de pesquisa desenvolvido no BAMM Labs. Embora da indisposição de um microscópio para confirmação dos espécimens, é comum a presença de tais micro-organismos em ambientes internos ou externos, com a presença de água parada ou mesmo em água potável.

## 4.1 Plataforma Holográfica em Multi-frame

### 4.1.1 Preparação das Amostras

Amostras biológicas humanas foram utilizadas para validação da plataforma holográfica em *multi-frame* proposta, bem como solução algorítmica para melhoramento da resolução. Dos vários tipos de amostras biológicas verificadas na plataforma baseada em deslocamento da fonte luminosa, para o presente trabalho apenas amostras de células humanas reprodutoras masculinas foram utilizadas. Células reprodutoras humanas, ou mais especificamente espermatozoides, referem-se às células reprodutoras masculinas com dimensões na ordem de  $3\ \mu m$  por  $5\ \mu m$  na cabeça, com cauda correspondendo a aproximadamente  $50\ \mu m$  de comprimento, e medindo  $\approx 0.6\ \mu m$  de espessura [49]. Células reprodutoras masculinas são particularmente interessantes de serem observadas, pois apresentam morfologia e características únicas, podendo inclusive serem facilmente identificadas na plataforma proposta mesmo sem a necessidade de confirmação microscópica. Outros tipos de células, por sua vez, devido ao formato circular comum entre demais fragmentos que podem ser encontrados no meio fluídico, requerem a confirmação do campo de brilho ou fluorescente de um microscópio óptico convencional. Alguns exemplos da aplicação da plataforma holográfica em outros tipos de amostras biológicas serão preliminarmente descritos na seção de trabalhos futuros deste documento.

Amostras com as células reprodutoras masculinas foram preparadas pelos colaboradores no laboratório BAMM Labs do MIT. O procedimento de preparação foi o descongelamento das amostras a 37 graus Celsius, e então a amostra foi diluída em uma solução 1:20 com o meio fluídico BSA HTF (fluído tubal humano utilizado em fertilização). Em seguida,  $10\ \mu l$  foram adicionados sobre uma lâmina microscópica, e então montados com uma cobertura de vidro com dimensões de  $8 \times 8\ mm$  [104].

As amostras foram imageadas utilizando a plataforma holográfica apresentada, e em seguida, para a mesma região na lâmina contendo a amostra, a análise com microscopia convencional óptica foi utilizada. Na plataforma de holografia em *multi-frame*, múltiplos deslocamentos foram realizados para a obtenção do conjunto de baixa-resolução, em geral

realizados com passo milimetrado. Para o conjunto, uma única imagem em alta-resolução foi computada, e decodificada pelo método numérico descrito no capítulo anterior. A validação da plataforma holográfica proposta foi realizada com um microscópio invertido Carl Zeiss Axio Observer-Z1, no BAMM Labs. No entanto, como o FOV de um microscópio capturando imagens a 10x apresenta uma área de leitura bastante reduzida em relação aos  $30 \text{ mm}^2$  da plataforma holográfica, imageamento com composição de mosaico foi utilizado na confirmação microscópica, onde imagens em campo de brilho foram adquiridas para comparação visual e localidade espacial.

#### 4.1.2 Resultados da Abordagem em Multi-Frame para Melhoria da Resolução

Um aspecto importante a ser verificado na holografia digital em termos de resultados quantitativos e qualitativos é o nível do sinal holográfico projetado sobre o sensor de imageamento e recuperado computacionalmente. Na holografia, a informação pode ser dividida em 2 partes segundo a teoria da difração: (i) informação de sinal de baixa-frequência e (ii) e sinal de alta-frequência. Ambos os sinais são importantes na holografia, mas principalmente a informação de alta-frequência diz respeito à informação da periferia do objeto no plano-detector. Quanto maior o número de ciclos que um sinal holográfico possui, conseqüentemente melhor é a imagem resultante da morfologia do objeto imageado.

O exemplo apresentado através da Figura 4.1 ilustra de forma geral o objetivo da plataforma holográfica proposta. Ao lado esquerdo da figura os hologramas originais foram capturados pela plataforma apresentada, de modo que um holograma de alta-resolução é computado a partir de múltiplas observações da cena em diferentes pontos da fonte de iluminação. Cada holograma apresentado é aplicado ao compasso *Prewitt*, sendo este exclusivamente utilizado para propósitos de visualização, uma vez que certos detalhes podem não ser completamente perceptíveis nos hologramas originais. O compasso de *Prewitt*, demonstrado ao lado direito da Figura 4.1, é um simples operador discreto de diferenciação, utilizado para computar uma aproximação do gradiente de uma função de

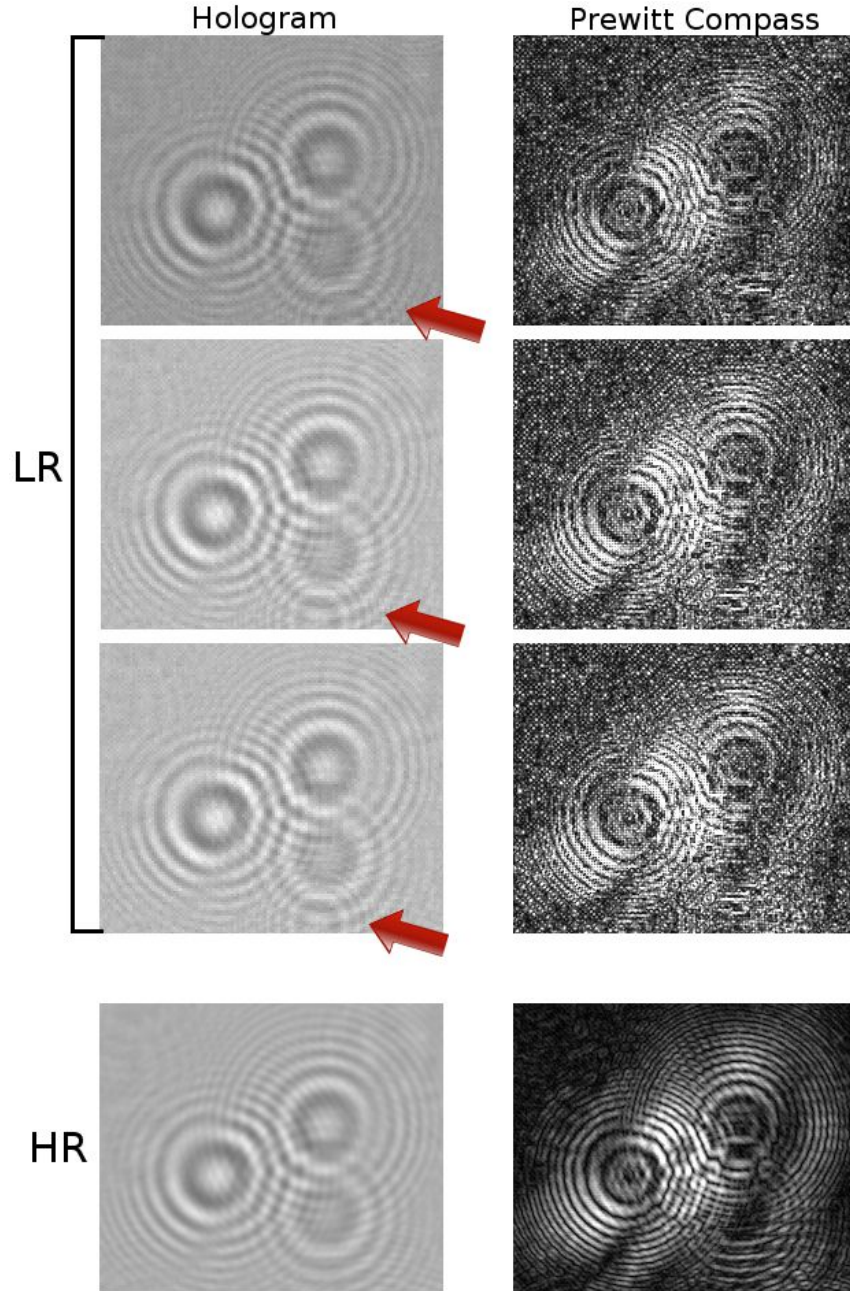


Figura 4.1: Compasso de *Prewitt* aplicado sobre hologramas do conjunto de baixa-resolução e sobre o holograma em alta-resolução resultante. As setas nos hologramas de baixa resolução indicam ruído, que é suprimido na imagem em alta-resolução.

intensidade da imagem, sendo este melhor compreendido como ou o vetor do gradiente ou a norma deste vetor em cada ponto na imagem. Dois principais aspectos serão discutidos para os hologramas em alta-resolução nesta Seção: (i) incremento dos aspectos de resolução através da recuperação da informação faltante e propagação dos sinais holográficos; (ii) efeito de supressão temporal e espacial de ruído, obtido pela somatória de múltiplas observações da cena.



Para o primeiro aspecto, melhoria na qualidade do sinal bem como incremento da propagação das franjas holográficas podem ser verificados para os hologramas em alta-resolução apresentados nesta Seção. Inicialmente, a recuperação dos anéis concêntricos e melhoramento da morfologia do holograma pode ser observado no holograma em alta-resolução da Figura 4.1, bem como apresentados e quantificados nos próximos exemplos demonstrados. O aspecto de recuperação de informação, no entanto, devido às etapas de registro e somatória sucessiva de múltiplas imagens, invariavelmente propicia também a supressão de ruído. Ainda na Figura 4.1, o ruído produzido através de partículas falso-positivo são ilustrados através das setas indicativas, apresentadas nas imagens em baixa resolução, sem tratamento de sub-pixel. Estas setas indicam sombras holográficas que são projetadas sobre o sensor, a partir de diferentes plano-objetos, que são deslocadas espacialmente conforme ocorre a movimentação da fonte luminosa. Pode ser verificado que, tais sombras são deslocadas para a esquerda, e são suprimidas na imagem em alta-resolução através da distribuição espacial destes sinais.

Estes tipos de artefatos físicos indesejados, tais como minúsculas partículas de poeira ou mesmo riscos nas lâminas microscópicas, acabam introduzindo na imagem resultante a projeção de suas assinaturas holográficas. Durante o processo de registro inicial do conjunto de baixa resolução, filtragem espacial é realizada de uma forma bastante intuitiva: estes artefatos podem ser suprimidos e redistribuídos ao longo da imagem holográfica em alta resolução, dependendo do tamanho do passo utilizado no deslocamento. Este efeito de supressão é possível de ser obtido sem qualquer adição no hardware ou computação de software graças ao efeito da difração da luz para diferentes planos-objetos ( $z$ -axis) quando o deslocamento da fonte luminosa é realizado. Assinaturas holográficas oriundas do mesmo plano-objeto produzem um deslocamento das sombras de maneira linear. Este efeito, por sua vez, não é obtido por assinaturas em diferentes planos, produzindo deslocamento com velocidades diferentes das sombras localizadas no mesmo plano. Desta forma, como o vetor global de deslocamento é computado sobre as *key-points* “bem comportadas”, tais artefatos não participam da etapa de registro inicial, e a matriz de homografia não recebe os referidos *key-points*. Por fim, durante o processo de computação da informação



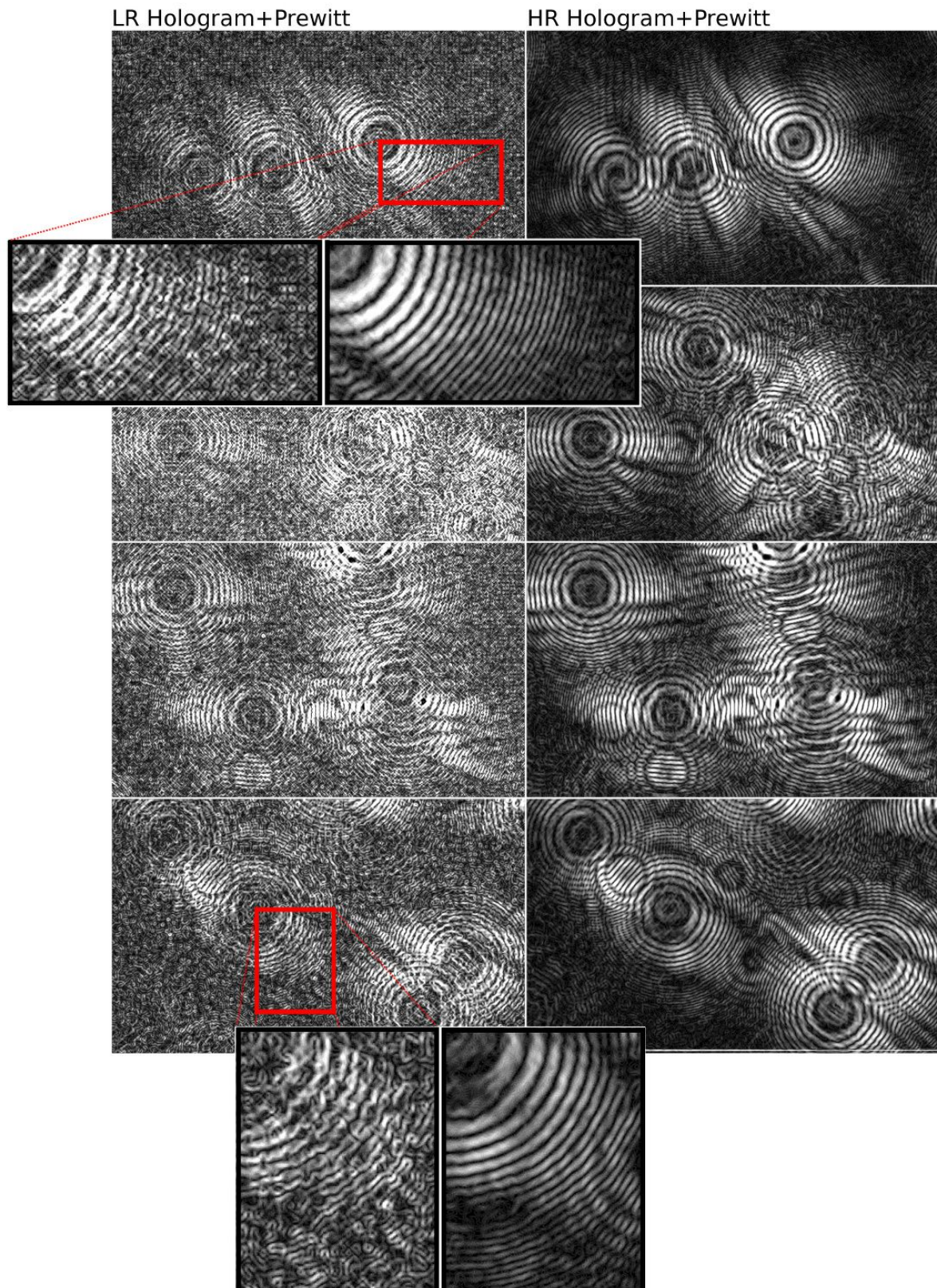


Figura 4.2: Comparação dos sinais holográficos obtidos pela plataforma holográfica proposta. Ao lado esquerdo e direito, hologramas de baixa resolução e a reconstrução obtida a partir de múltiplas imagens são demonstradas, respectivamente.

de sub-pixel, as sombras de artefatos de diferentes planos-objetos serão re-distribuídas espacialmente na imagem de alta-resolução do holograma.

Além dos aspectos de ruído produzidos por artefatos físicos, outro tipo de supressão é obtida através da simples somatória de múltiplos *frames* na cena, temporalmente. O sinal de ruído pode ser introduzido por questões físicas ou do próprio ambiente, tal como o efeito oscilatório de diferentes intensidades de onda, ou dos próprios efeitos de captura do sensor sobre o tempo. Estas inomogeneidades podem ser claramente observadas nas imagens em baixa-resolução, mais especificamente nas regiões de *background* do sinal, onde somente as frentes de onda são projetadas (sem a interferência da interceptação de qualquer partícula).

Outro exemplo é apresentado através da Figura 4.2, onde os hologramas foram submetidos ao compasso de *Prewitt*, e aspectos de melhoramento de resolução, incremento da propagação do sinal holográfico, e supressão de ruído podem ser verificados. Ao lado esquerdo hologramas em baixa-resolução são ilustrados, enquanto que a reconstrução do sinal correspondente em alta-resolução é demonstrada ao lado direito. Pode ser observado através de uma comparação visual dos hologramas em baixa e alta-resolução uma melhora significativa na recuperação da informação de anéis concêntricos dos hologramas, bem como aspectos de supressão de ruído. Os retângulos em destaque (cor vermelho) na imagem indicam áreas onde um fator de ampliação de *zoom* foi aplicado para efeitos de comparação do sinal obtido.

Para os hologramas obtidos em alta-resolução, a periodicidade e número de ciclos de onda pode ser um fator importante de mensuração qualitativa e principalmente qualitativa da qualidade para a plataforma baseada em múltiplos frames. Uma estimativa qualitativa pode ser obtida através da análise das franjas holográficas, que pode ser realizada ao longo de uma axis qualquer, conforme ilustrado através da Figura 4.3. Em (a) e (b) são apresentados hologramas a partir de um único *frame*, e sua reconstrução em alta-resolução correspondente, respectivamente. Em (a) pode ser observado uma linha na cor verde, enquanto que em (b) uma linha na cor vermelha é apresentada. A mensuração da intensidade do sinal holográfico para ambas as linhas é apresentada na Figura 4.4, onde



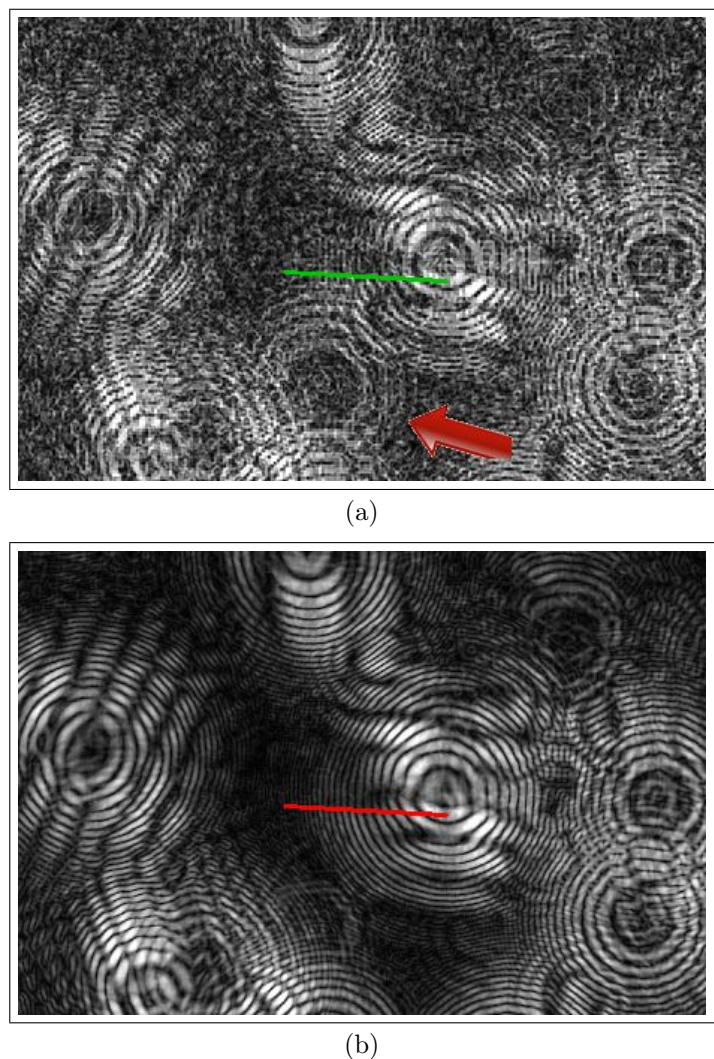


Figura 4.3: Comparação de sinais holográficos em baixa resolução (a) em relação a mesma imagem, reconstruída a partir de um conjunto de múltiplas imagens (b). Linhas em verde e vermelho para ambas as imagens indicam a mensuração das intensidades de gradiente para os hologramas, respectivamente, conforme Figura 4.4. A seta em vermelho em (a) indica hologramas suprimidos na imagem em alta-resolução.

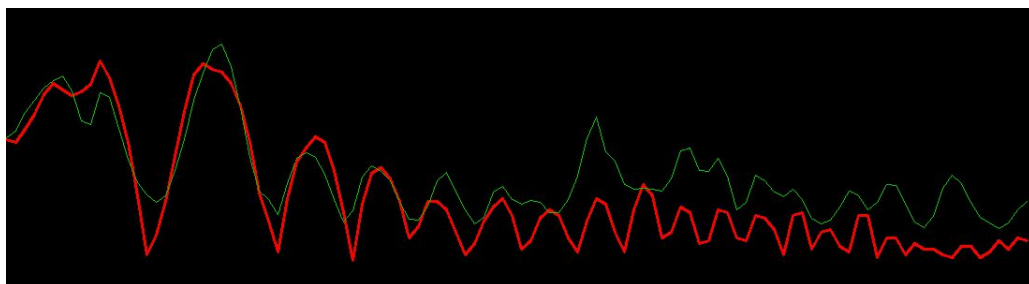
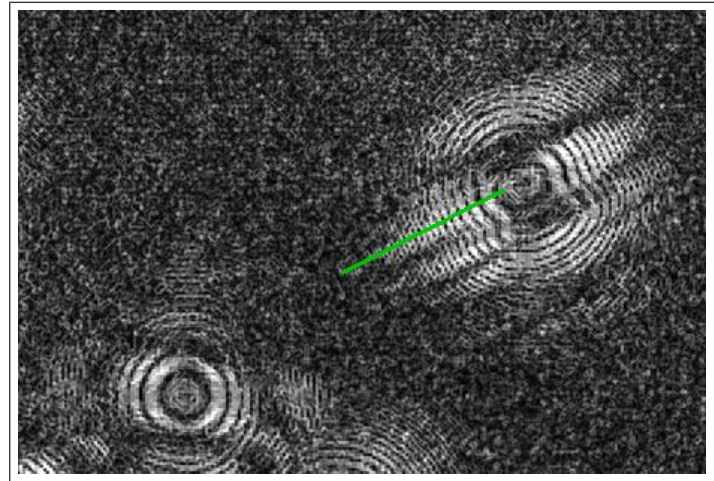


Figura 4.4: Mensuração das intensidades de gradiente realizada através das linhas verde e vermelho, demonstradas na Figura 4.3. É possível verificar que a imagem de alta-resolução apresenta sinal com maior regularidade e discriminação do sinal, bem como efeito de propagação da onda.

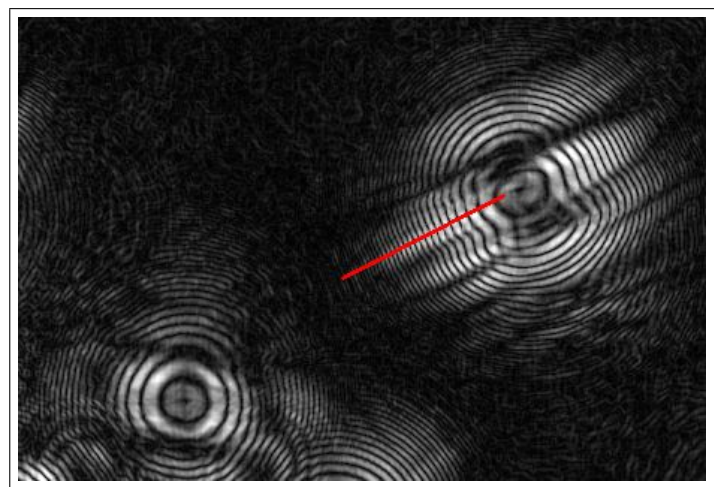
a análise dos picos de gradiente para cada holograma é computado. A análise da periodicidade do sinal revela que o holograma em alta-resolução apresenta melhor discriminação, regularidade (constância), e propagação do sinal holográfico, quando comparado com o holograma em baixa-resolução obtido a partir de um único *frame*. Para os hologramas em alta-resolução, onde a informação de topologia dos anéis concêntricos é melhorada e recuperada, o número de picos no gráfico de intensidades é consistentemente maior que o sinal apresentado pelo holograma em baixa-resolução. Também na Figura 4.3, é possível verificar a seta em vermelho, novamente indicando a projeção de sombras de artefatos localizados em planos-objeto distintos, demonstrando o efeito de supressão espacial do ruído.

Através desta análise quantitativa da periodicidade, também é possível verificar a interferência causada pelo ruído, e como este se comporta nos hologramas em baixa resolução. Através da supressão do sinal, maiores picos de mínima e máxima de gradiente são obtidos nas imagens em alta resolução. Para o caso anteriormente apresentado é possível verificar que a periodicidade do sinal holográfico tende a prevalecer nos hologramas em alta resolução, enquanto que nos hologramas obtidos a partir de um único *frame*, a periodicidade pode ser verificada até o sétimo ou oitavo ciclo de onda somente. Outro resultado interessante é ilustrado através da Figura 4.5, através da análise de sinal correspondente na Figura 4.6, onde as variações de mínimo e máximo, bem como a periodicidade e constância do sinal é bastante evidente para o holograma em alta-resolução analisado.

Análise da periodicidade do sinal holográfico é também apresentada para os exemplos das Figuras 4.7 e 4.8. Para a Figura 4.7-baixo, é possível verificar a sobreposição do sinal holográfico proveniente de várias células reprodutoras masculinas, de modo que o sinal holográfico torna-se um padrão completo de difração. É possível verificar através do gráfico plotado na parte superior da figura correspondente hologramas em baixa-resolução perdem a referência de periodicidade do sinal, enquanto que para o holograma correspondente em alta-resolução esta periodicidade pode ser recuperada. Outra análise é realizada para os hologramas apresentados através da Figura 4.8. Para ambos os casos, a análise quantitativa é realizada sobre uma axis de maior comprimento, englobando toda a proje-



(a)



(b)

Figura 4.5: Comparação de sinais holográficos em baixa resolução (a) em relação a mesma imagem, reconstruída a partir de um conjunto de múltiplas imagens (b). Linhas em verde e vermelho indicam a mensuração das intensidades de gradiente para os hologramas em baixa e alta-resolução, respectivamente, conforme Figura 4.6.

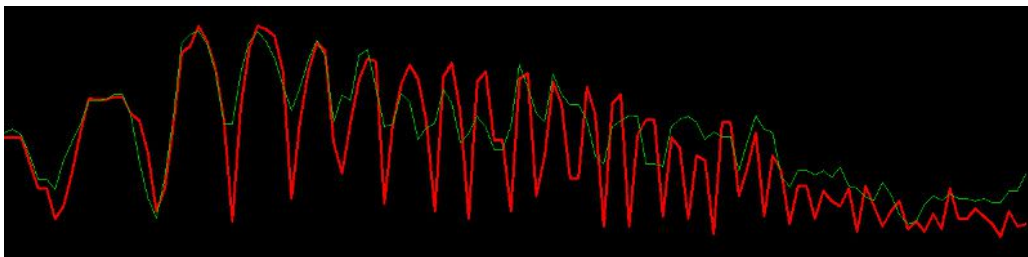


Figura 4.6: Mensuração das intensidades de gradiente realizada através das linhas verde e vermelho, demonstradas na Figura 4.5. O gráfico demonstrado neste exemplo apresenta uma maior discriminação para os picos de gradiente, bem como constância e periodicidade para o sinal holográfico.



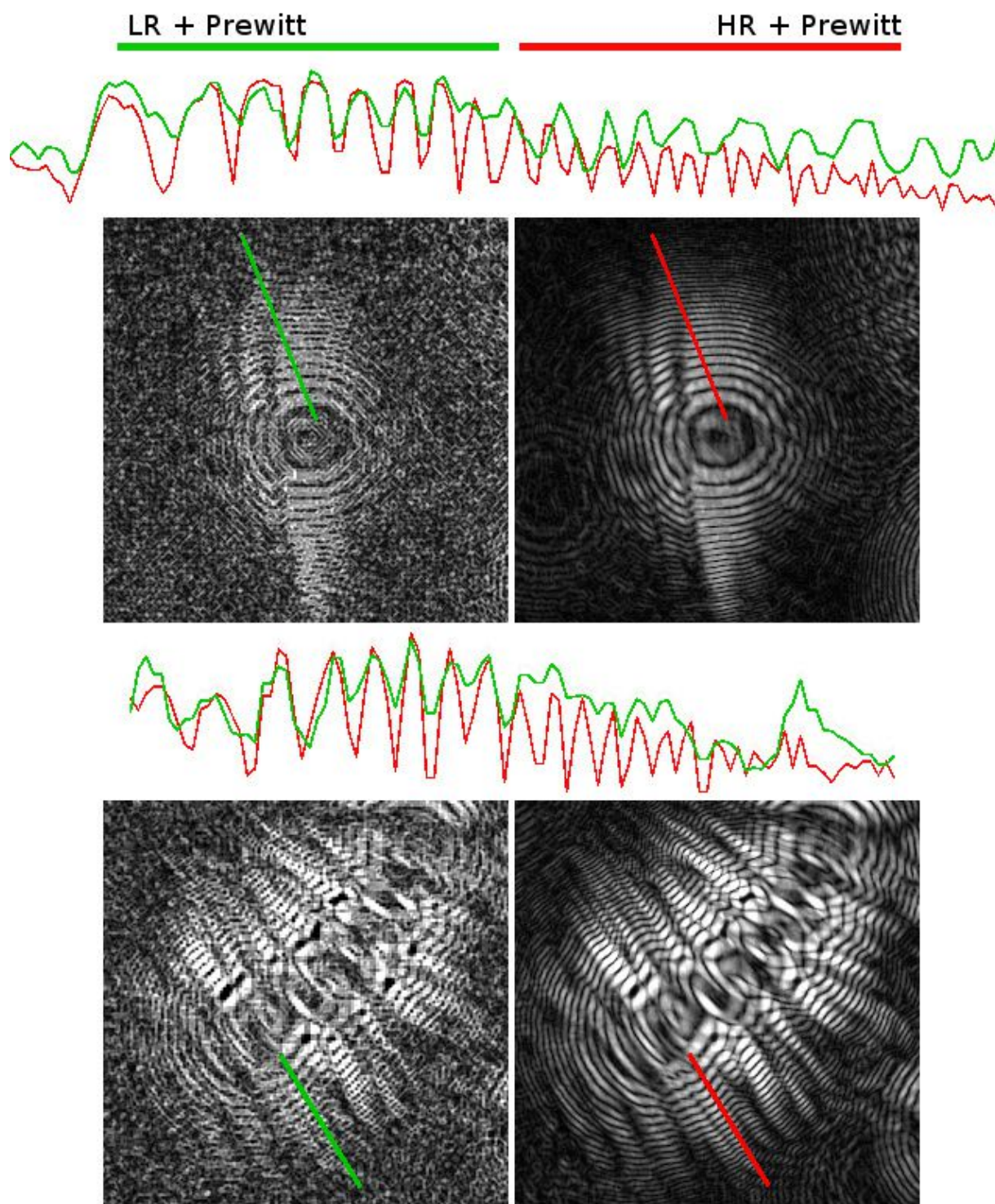


Figura 4.7: Análise quantitativa do sinal holográfico para a plataforma proposta. Para a primeira e segunda coluna, hologramas e baixa e alta-resolução são apresentados, respectivamente. Acima de cada conjunto de hologramas, o gráfico das intensidades relativas dos *pixels* das linhas vermelha e verde são apresentados, correspondendo às medições dos hologramas em baixa e alta-resolução.

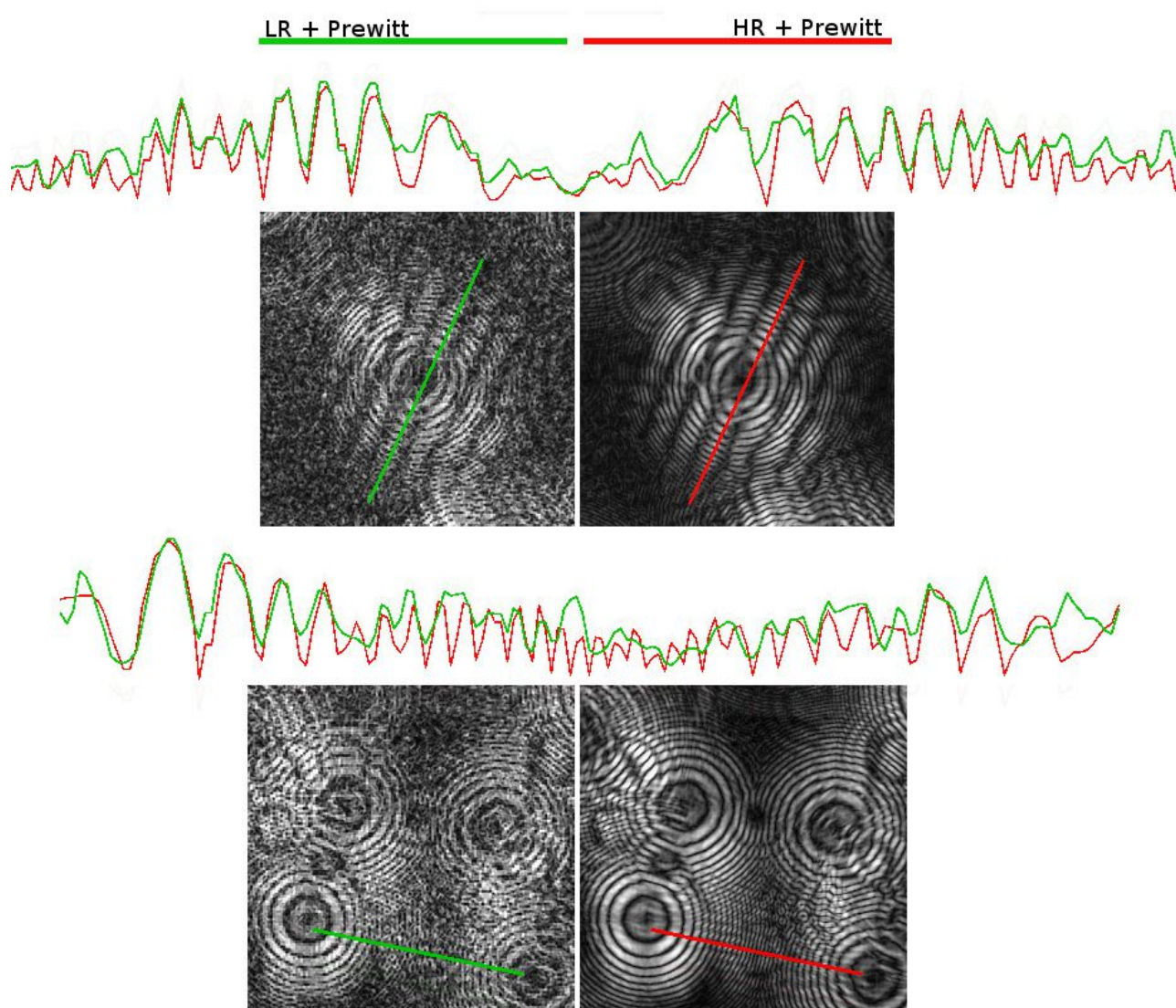


Figura 4.8: Análise quantitativa do sinal holográfico para a plataforma proposta. Para a primeira e segunda coluna, hologramas e baixa e alta-resolução são apresentados, respectivamente. Acima de cada conjunto de hologramas, o gráfico das intensidades relativas dos *pixels* das linhas vermelha e verde são apresentados, correspondendo às medições dos hologramas em baixa e alta-resolução.

ção do holograma (exemplo figura superior), e conectando os centros de dois hologramas distintos (exemplo figura inferior). Ambos os exemplos sugerem claramente uma melhora na recuperação da informação faltante de onda para os hologramas em alta-resolução.

Vídeos demonstrativos da execução do processo de alinhamento e otimização da informação de sub-pixel são apresentados no material suplementar desta tese. Estes vídeos ilustram a seleção de regiões de interesse no FOV, onde o conjunto de baixa resolução é ali-

nhado. Mensurações de periodicidade ao longo dos hologramas em baixa e alta-resolução são demonstrados em cada vídeo contido no material suplementar.

### 4.1.3 Validação e Análise Microscópica

Validação e análise microscópica foi adotada como um procedimento padrão a cada amostra biológica humana imageada pela plataforma holográfica proposta. O primeiro aspecto importante da análise microscópica é a localidade espacial de onde as células de interesse se encontram na lâmina, uma vez que o imageamento ocorre em escala microscópica e pequenos deslocamentos correspondem a grandes distâncias na imagem digitalizada. Um segundo aspecto é a resolução de profundidade, uma vez que pelo princípio da difração escalar, um holograma comporta toda informação 3D que o plano de onda intercepta verticalmente, e o ajuste de foco deve ser realizado para obtenção da correta forma geométrica da amostra. Para o caso de células humanas reprodutoras masculinas, o formato do espermatozoide é bastante discriminante, apresentando estruturas morfológicas que podem ser facilmente identificadas durante o ajuste de foco.

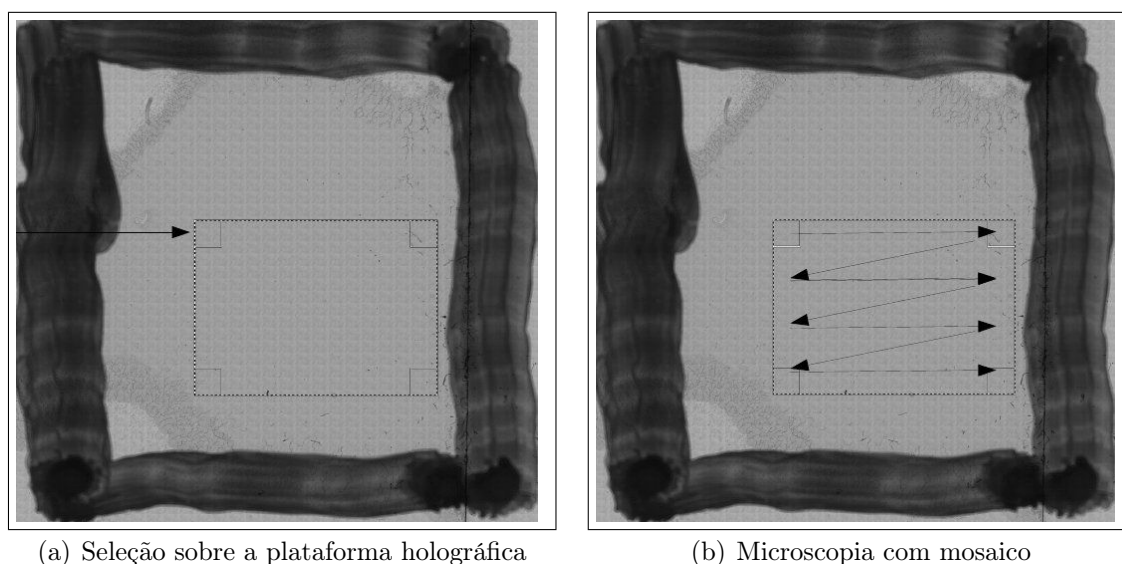


Figura 4.9: Procedimento adotado para a validação das imagens holográficas.

Para cada amostra utilizada (lâmina de microscopia), um procedimento de varredura foi adotado de maneira que uma região retangular é definida sobre a amostra posicionada sobre a plataforma holográfica. Esta região em geral corresponde proximamente ao FOV



da plataforma, conforme ilustração da Figura 4.9-(a). Após definida a região de interesse e coletados os hologramas, a confirmação microscópica ocorre com o imageamento utilizando o campo de brilho sobre a mesma região do imageamento holográfico. O recurso de mosaico é iniciado conforme ilustração da Figura 4.9-(b), onde uma imagem correspondendo a composição dos quadros vizinhos é obtida.

Várias amostras com células humanas reprodutoras masculinas foram imageadas (no próprio BAMM Labs), e um total de 8 lâminas seccionadas em 5 chips com amostras de células humanas foram selecionadas para inspeção holográfica e microscópica. Essencialmente, o resultado final da plataforma holográfica em termos de validação foi realizada qualitativamente, através da simples inspeção visual e correlação das imagens de difração e campo de brilho microscópico. Exemplo desta validação é apresentada através da Figura 4.10, onde o sinal de amplitude obtido da difração numérica é utilizado (esquerdo). Ao lado direito a confirmação microscópica para a mesma fração da amostra é apresentada. O campo de brilho do microscópio foi utilizado, imageado a partir de um microscópio convencional com fator de ampliação de 10X, e utilizando o recurso de mosaico para realizar a varredura da lâmina microscópica. O recurso de mosaico para as imagens microscópicas produz o efeito de quadriculamento devido ao encaixe de diferentes frações da imagem com variados efeitos de iluminação, conforme pode ser verificado em todas as imagens de campo de brilho apresentadas nesta Seção. Para alguns casos, pode haver falha de enquadramento do microscópio, e problemas de registro podem ser verificados para algumas porções da amostra imageada. Para alguns casos excepcionais, as falhas de enquadramento na imagem microscópica foram ignoradas no processo de validação, e de uma forma geral, este efeito não é impeditivo e não afeta a análise qualitativa dos resultados da plataforma proposta, quando comparados com a confirmação microscópica.

A análise qualitativa apresentada através da Figura 4.10 demonstra-se suficientemente rígida para a correlação e validação dos resultados obtidos pela plataforma holográfica, e os resultados de um microscópio óptico convencional, denominado de padrão-ouro. Pode ser observado ao longo dos resultados a visualização de estruturas morfológicas na escala de micrômetros, onde a cauda da célula reprodutora masculina apresenta medições na

Numerical Diffraction - Amplitude

Bright-field Microscopy

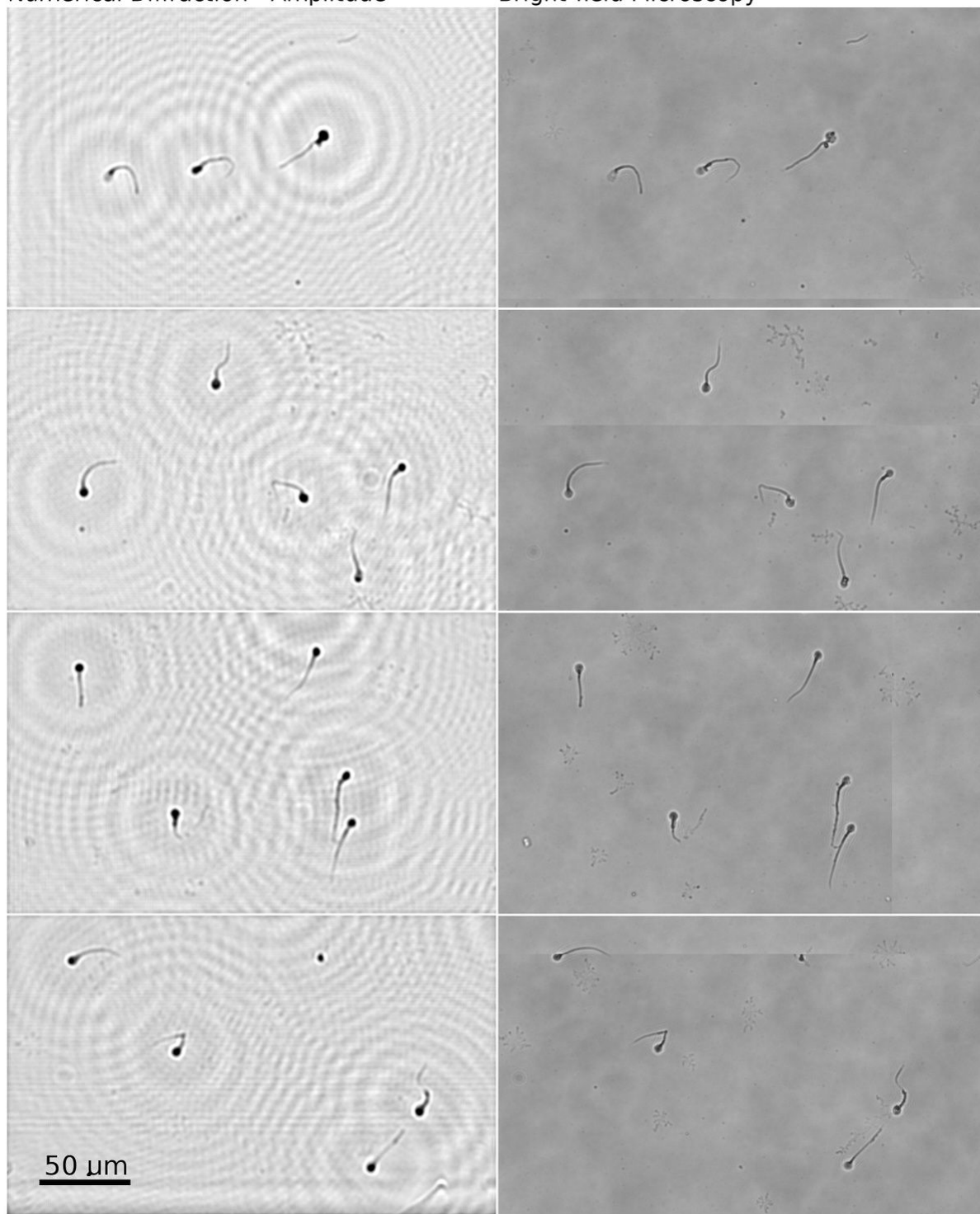


Figura 4.10: Comparação dos resultados obtidos pela plataforma holográfica proposta em *multi-frame* (lado esquerdo) e confirmação microscópica (lado direito). O holograma decodificado demonstra o sinal de amplitude para a imagem apresentada. A confirmação microscópica foi obtida utilizando um microscópio óptico convencional com recurso de mosaico.

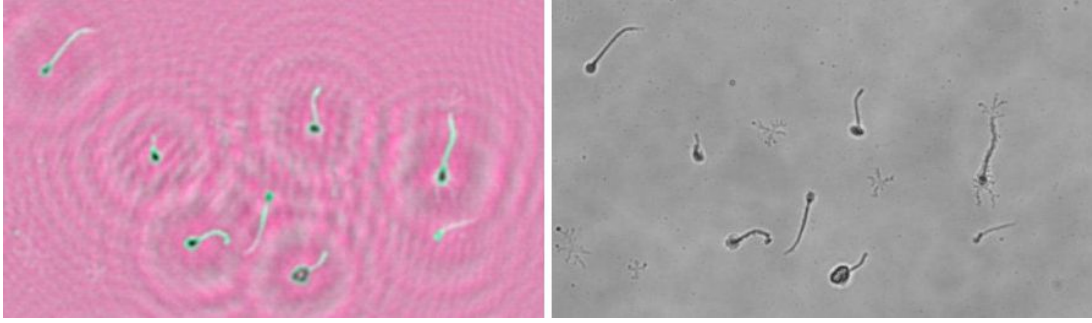


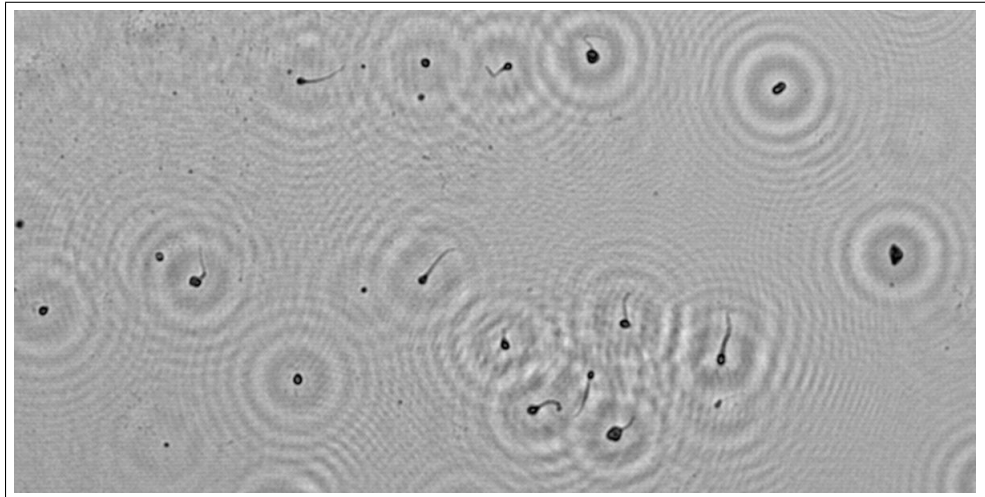
Figura 4.11: Comparação do sinal de composição  $C_{rgb}$  em relação a confirmação microscópica, apresentadas ao lado esquerdo e direito, respectivamente.

ordem de  $\approx 0.6\mu m$  de espessura [49], com alta correlação entre hologramas e microscopia óptica.

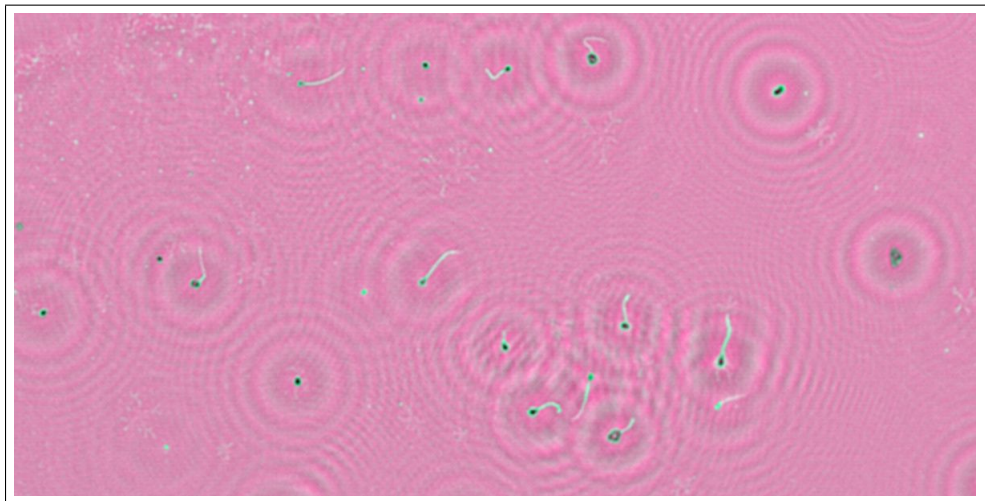
Além da informação do sinal de amplitude, conforme anteriormente descrito na Seção 3.3, sinal de fase pode ser também obtido a partir das partes  $\Re$  e  $\Im$ . Para o contexto de células humanas reprodutoras masculinas, a composição do sinal em uma imagem multi-dimensional  $C_{rgb}$  apresenta resultados bastante interessantes, provendo artifícios para a contagem e discriminação automatizada das imagens adquiridas<sup>1</sup>.

Na ilustração da Figura 4.11, o sinal  $C_{rgb}$  é demonstrado ao lado esquerdo, enquanto que a confirmação microscópica é apresentada ao lado direito, respectivamente. É interessante observar que a região de *background* apresenta uniformidade e discriminação dos demais elementos da cena, possibilitando o desenvolvimento de métodos bastante efetivos para a remoção de fundo. A cabeça da célula reprodutora também apresenta fator de discriminação em relação a cauda. Outros resultados experimentais com a respectiva validação por confirmação microscópica são apresentados através das Figuras 4.12 – 4.19. Nestes resultados, são demonstrados os sinais de amplitude, a composição  $C_{rgb}$ , e a respectiva confirmação microscópica em campo de brilho. Os resultados sugerem que a plataforma proposta pode ser utilizada como um microscópio portátil para a visualização de estruturas biológicas na ordem de alguns micrômetros. Através da validação qualitativa, a plataforma holográfica apresenta uma alta correlação das imagens obtidas em relação ao campo de brilho obtido em um microscópio óptico convencional.

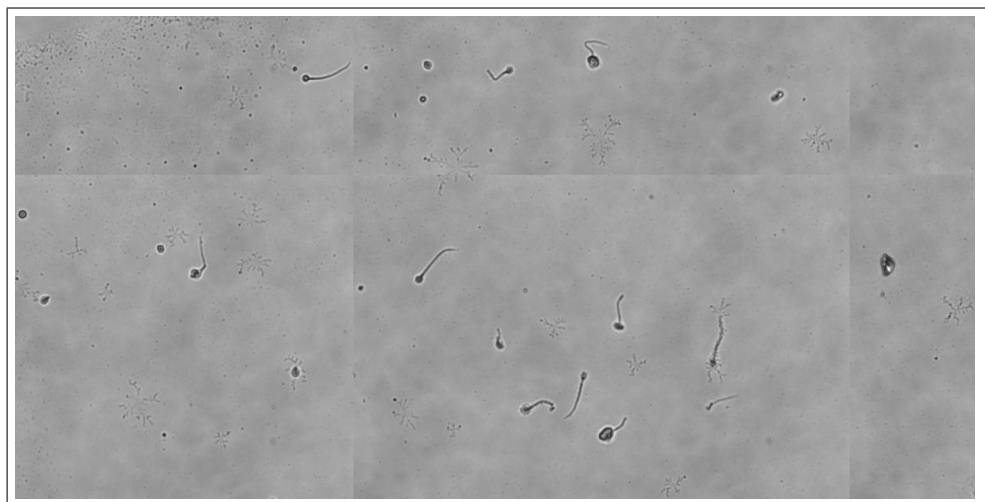
<sup>1</sup>A contagem e discriminação das células não corresponde ao escopo deste trabalho, sendo discutidos na seção de trabalhos futuros.



(a) Amplitude

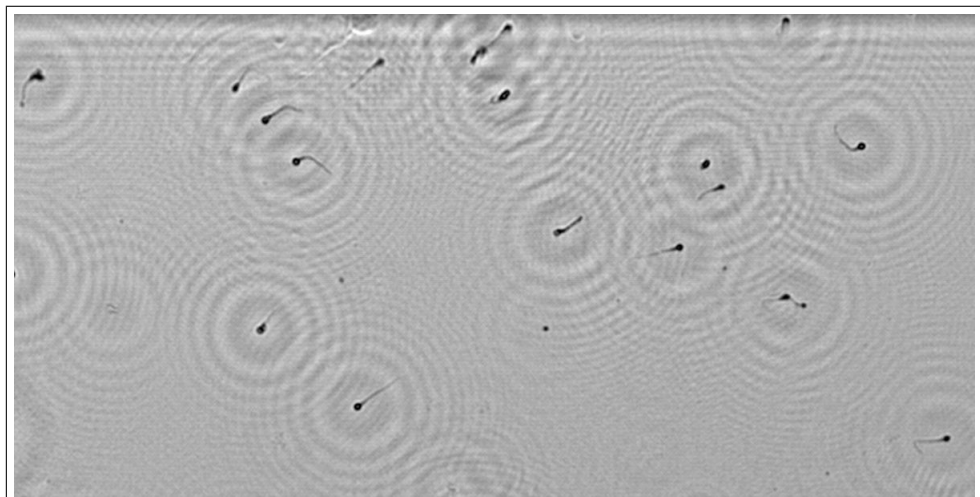


(b) Composição de sinal

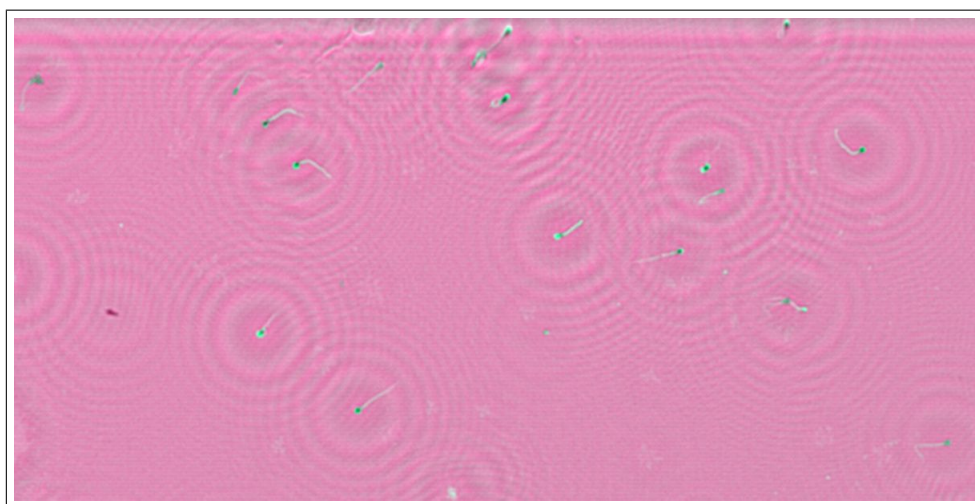


(c) Confirmação microscópica

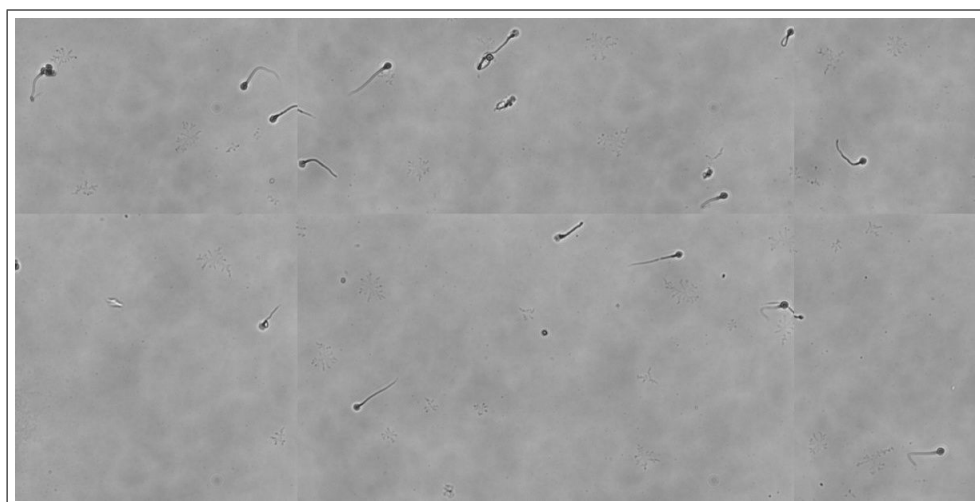
Figura 4.12: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.



(a) Amplitude



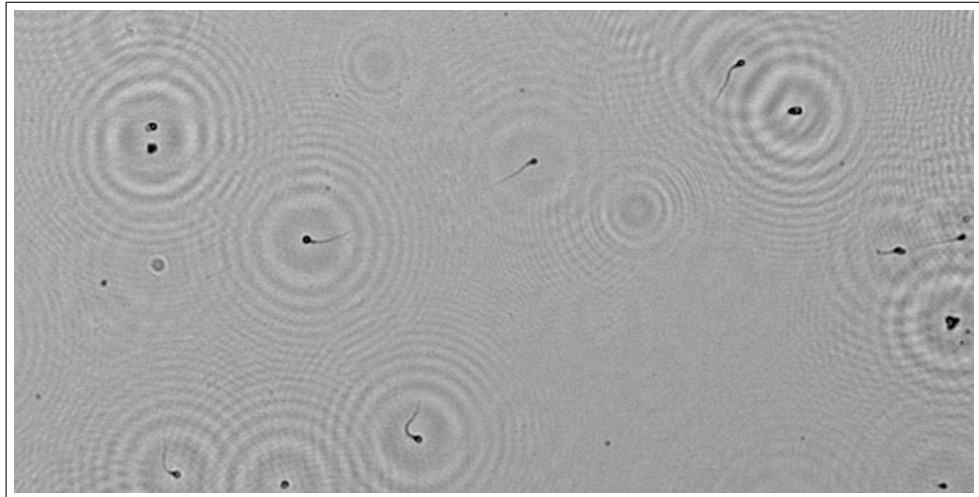
(b) Composição de sinal



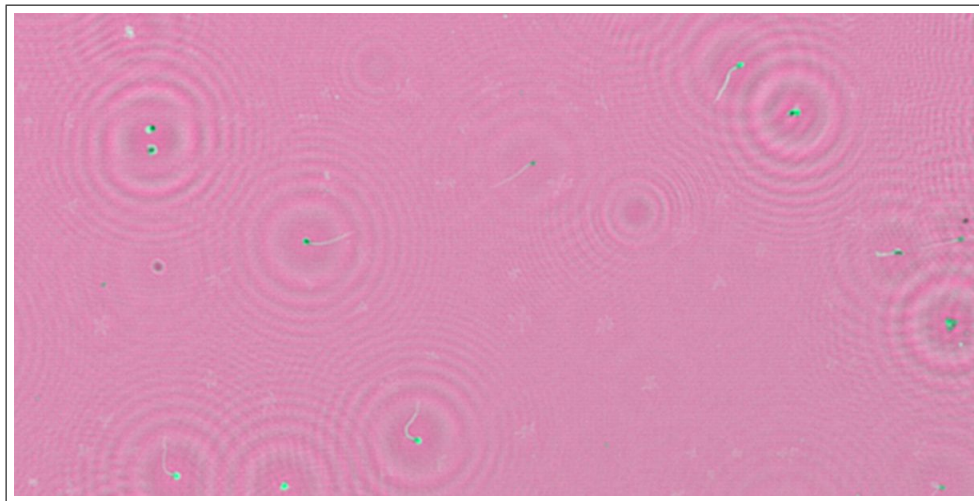
(c) Confirmação microscópica

Figura 4.13: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.

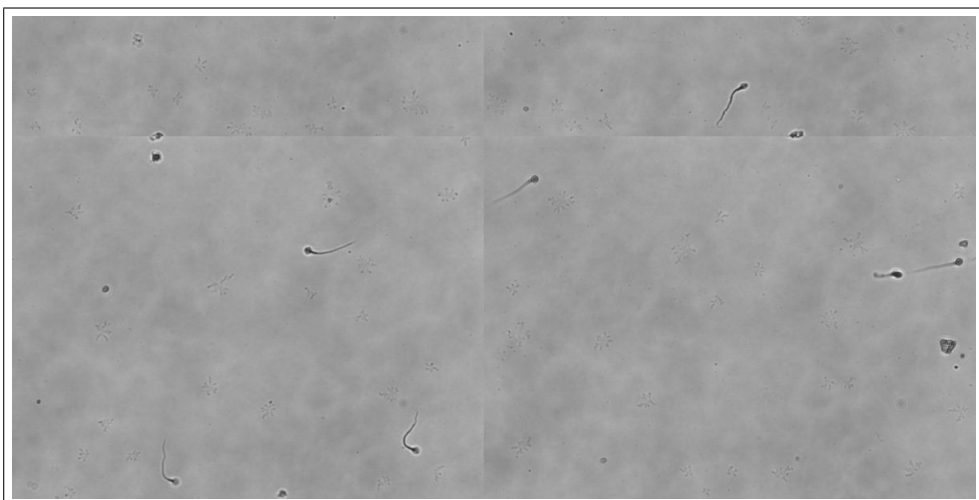




(a) Amplitude

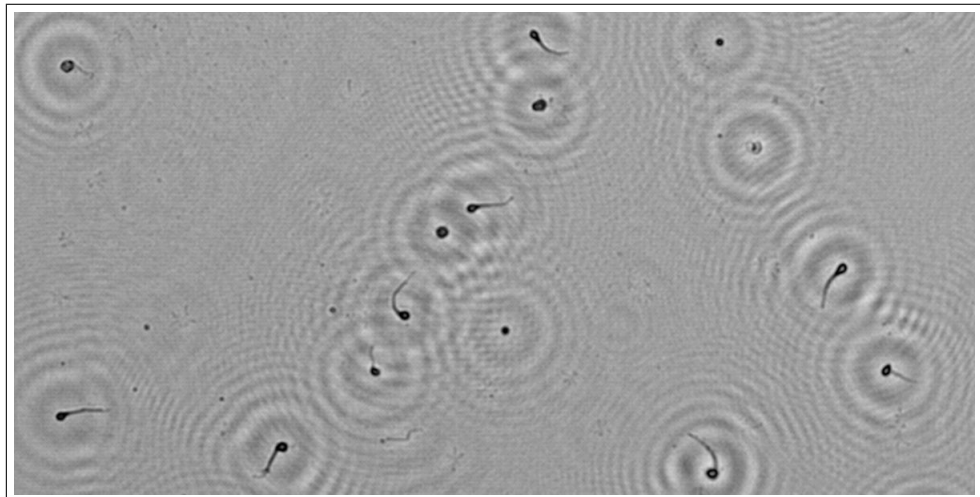


(b) Composição de sinal

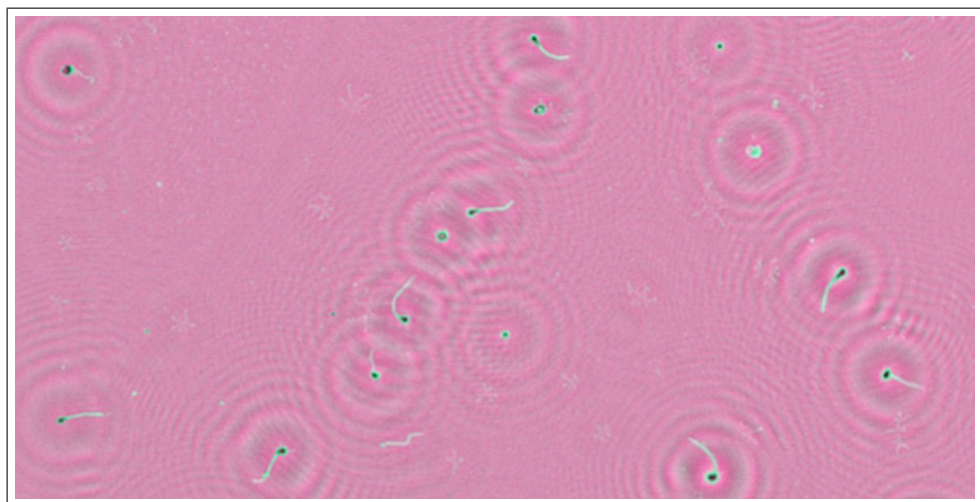


(c) Confirmação microscópica

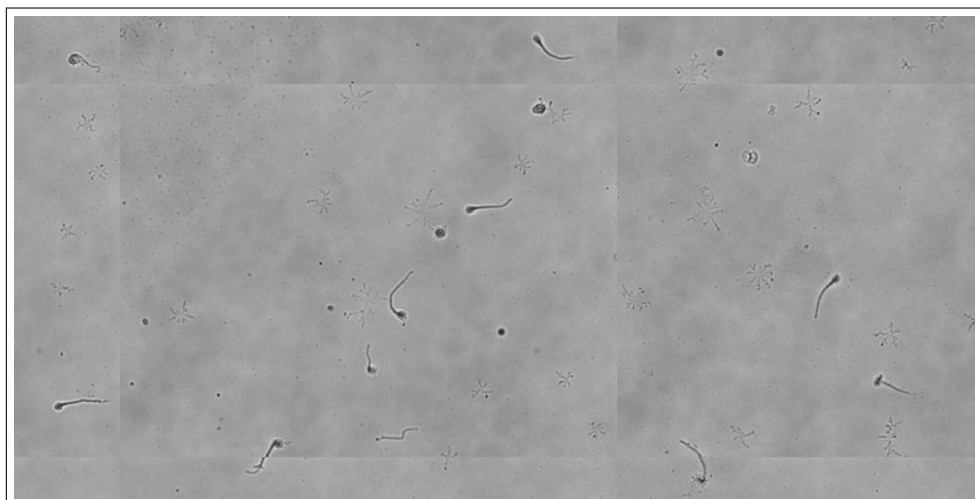
Figura 4.14: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.



(a) Amplitude

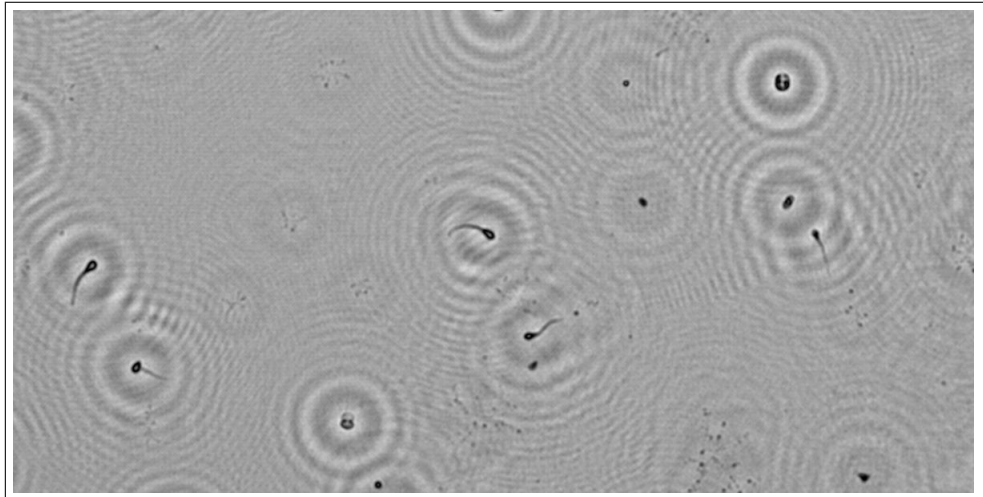


(b) Composição de sinal

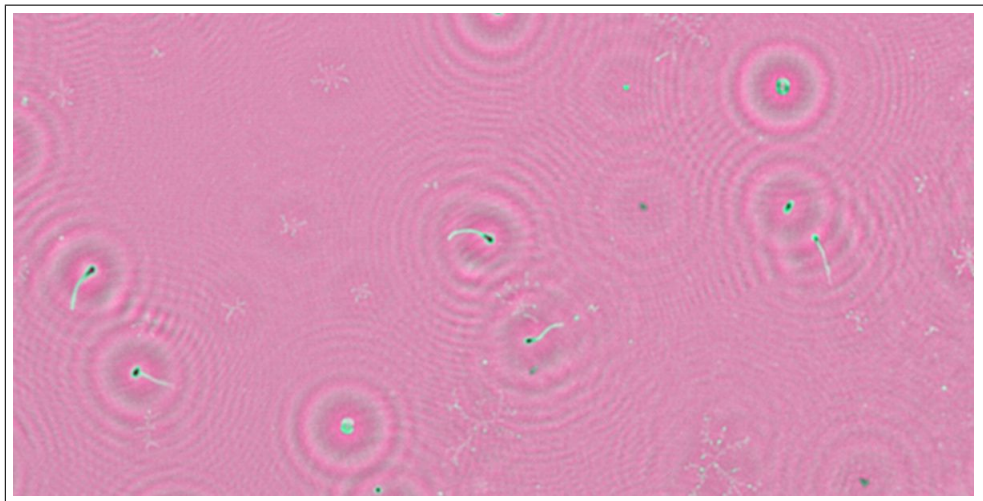


(c) Confirmação microscópica

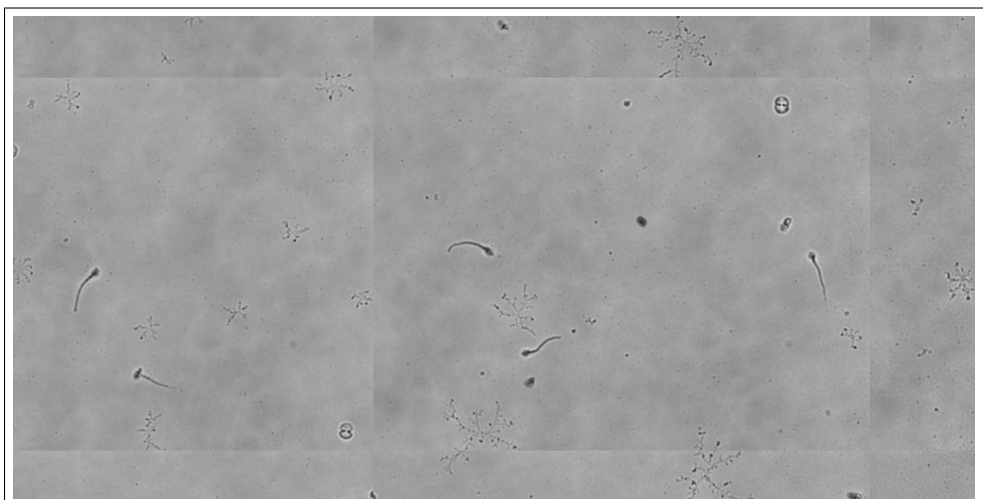
Figura 4.15: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.



(a) Amplitude



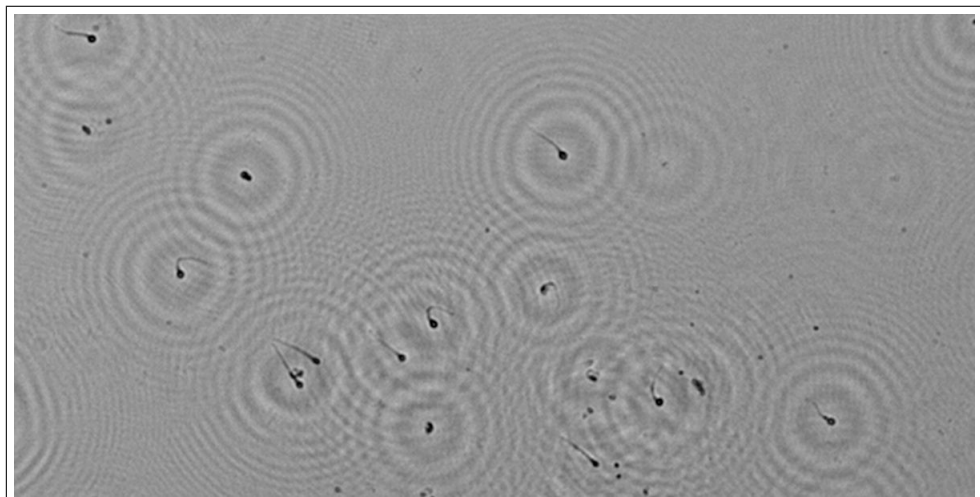
(b) Composição de sinal



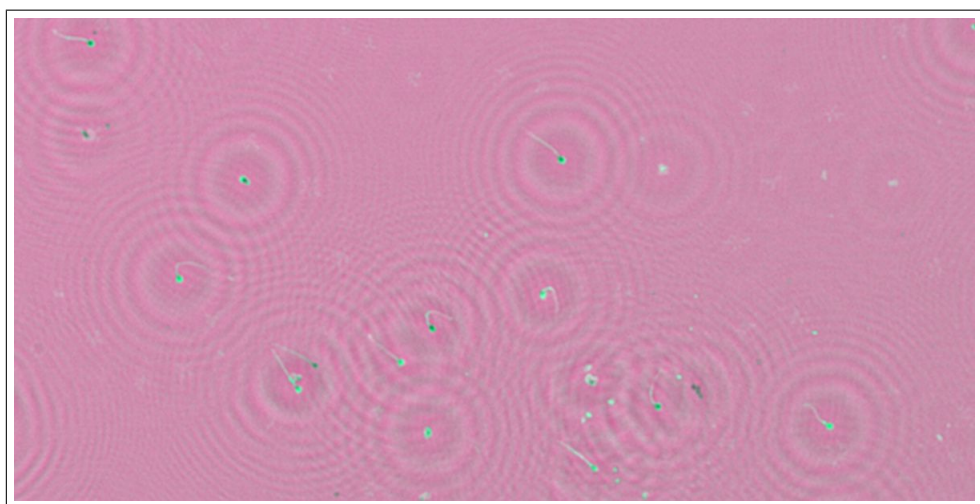
(c) Confirmação microscópica

Figura 4.16: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.

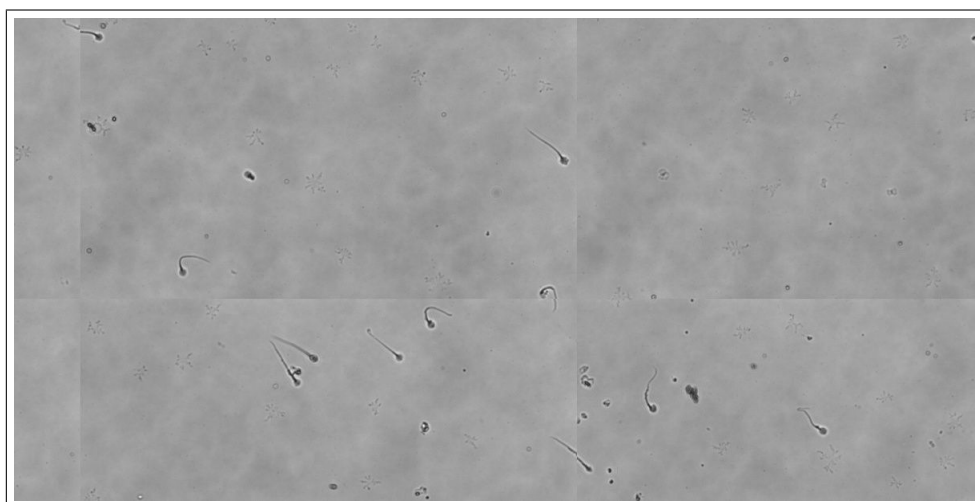




(a) Amplitude

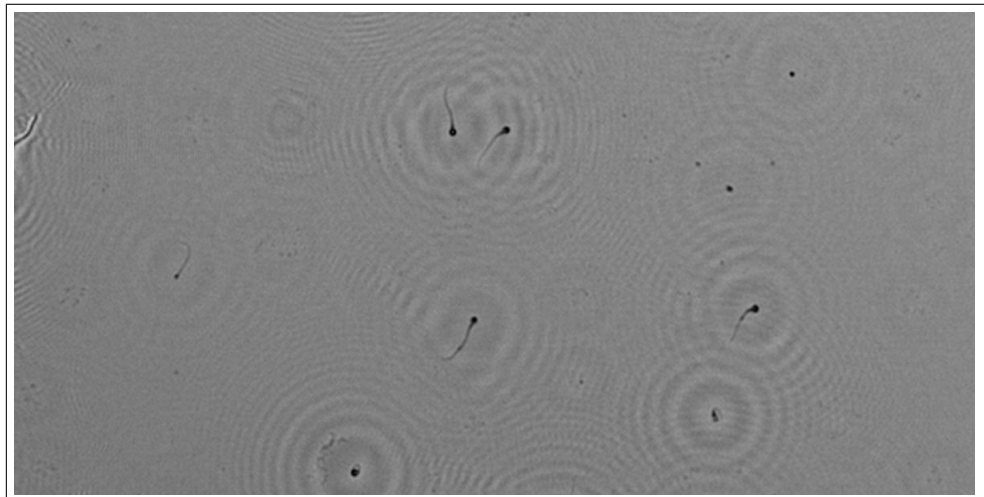


(b) Composição de sinal

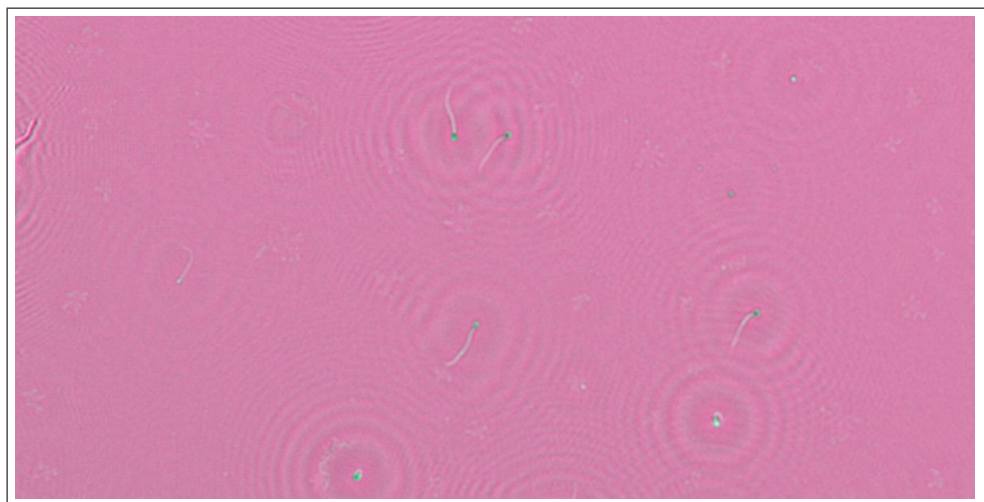


(c) Confirmação microscópica

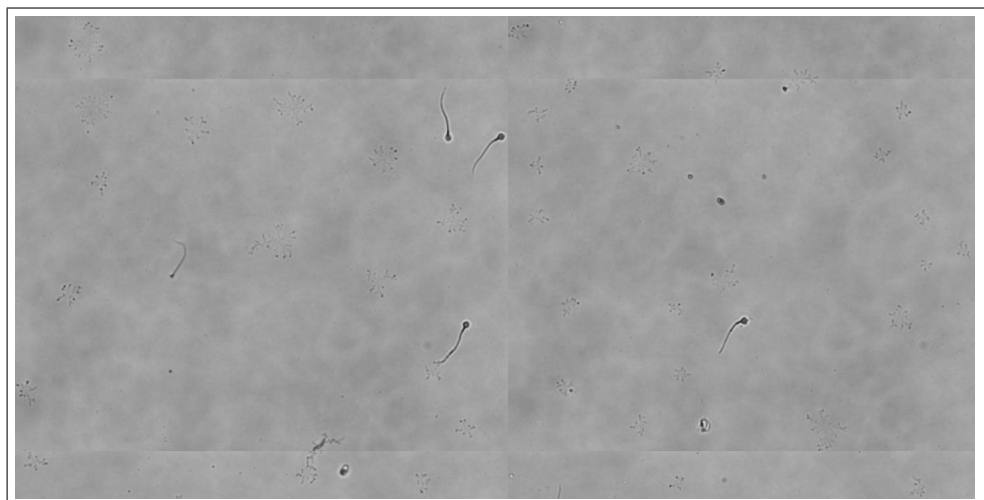
Figura 4.17: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.



(a) Amplitude

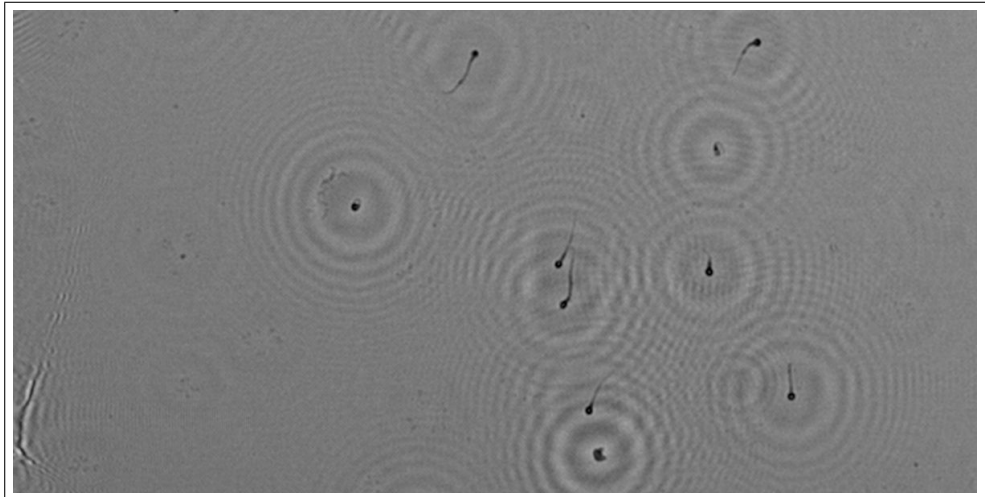


(b) Composição de sinal

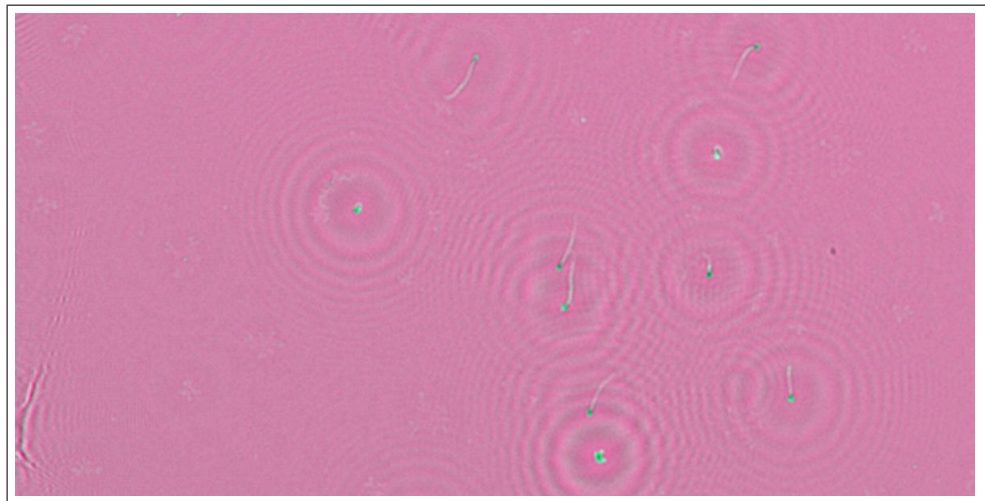


(c) Confirmação microscópica

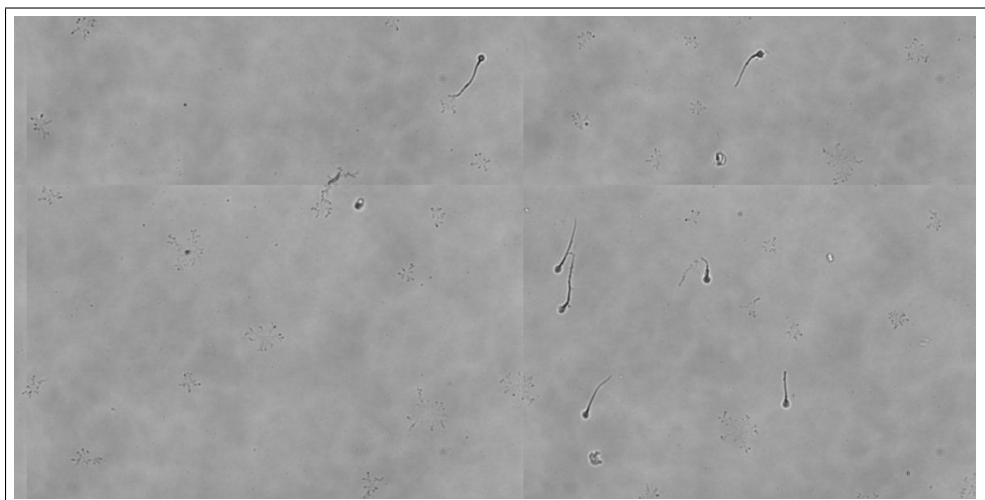
Figura 4.18: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.



(a) Amplitude



(b) Composição de sinal



(c) Confirmação microscópica

Figura 4.19: Resultados obtidos pela plataforma proposta X confirmação microscópica. Em (a) e (b), sinal de amplitude e composição  $C_{rgb}$  da plataforma holográfica, respectivamente. Em (c), validação por confirmação microscópica.

## 4.2 Plataforma Holográfica para Processamento em Vídeo

Nesta Seção serão discutidos os resultados experimentais da plataforma proposta para processamento holográfico em vídeo. Visualização microscópica em vídeo usualmente requer conjuntos de câmeras CCD ou CMOS acopladas ao próprio microscópio, tornando-se uma solução com um custo relativamente elevado. A evolução inicial do trabalho para uma variante de holografia em vídeo deu-se principalmente da necessidade de visualização de partículas ou amostras em movimento, levando em consideração uma plataforma portátil e de baixo custo. Ao longo da revisão da literatura verificou-se que algumas abordagens fazem uso de câmeras industriais com alta taxa de amostragem na ordem de milhares de *frames* por segundo para a aquisição de vídeo. No entanto, graças à evolução da tecnologia de imageamento por CMOS, concluiu-se que o mesmo sensor anteriormente utilizado para super-resolução dos hologramas, pode ser utilizado também para realizar capturas a altas taxas de amostragem, sob penalização da área útil do FOV.

Embora não atingindo a mesma resolução da plataforma inicialmente desenvolvida, principalmente devido ao fato do uso de diferentes sistemas de iluminação e inviabilização do uso de abordagem para computação em múltiplos *frames*, aplicações bastante interessantes podem ser desenvolvidas para o imageamento biológico em vídeo. Para o contexto biológico em POC, é bastante demandada a possibilidade de um sistema portátil para aquisição em vídeo a partir de amostras biológicas (sangue, urina, saliva, etc), integrado com análise automatizada de imagens para diagnóstico médico. Aplicações desta natureza envolvem desde o acompanhamento do estágio evolutivo de doenças ou vacinas, até a inspeção de processos metabólicos celulares, tal como ocorre em células cancerígenas.

Não obstante, uma plataforma portátil de propósito geral pode ser utilizada como uma ferramenta de *Point-of-Need*, e qualquer forma biológica ou partículas sólidas encontradas na natureza podem ser visualizadas. Exemplo de análises passíveis de serem realizadas envolvem, por exemplo, micro-organismos uni ou pluricelulares, protozoários, ou organismos mais complexos tais como vermes e parasitas na escala microscópica, que desempenham papel importante na natureza. Desta forma, é possível em uma plataforma holográfica a inspeção de micro-organismos *in-situ*, vivendo em seu próprio ambiente na-

tural, e atuando como marcadores de um ecossistema local, tipicamente encontrados meios fluídicos de água potável e livre de contaminação. Com estas amostras, várias análises podem ser realizadas envolvendo a morfologia ou simplesmente a quantificação do número absoluto de espécimens, além dos mesmos benefícios anteriormente apresentados, através da integração com recursos computacionais e análise automatizada de imagem.

As amostras utilizadas para testes na plataforma holográfica para processamento em vídeo podem ser encontradas livremente na natureza em ambientes fluídicos. Assim como a água é um elemento essencial para a vida, o meio fluídico é *habitat* natural de muitas espécies de micro-organismos. A preparação das amostras para a experimentação da plataforma holográfica em vídeo consiste simplesmente na coleta de um pequeno volume de fluído no ambiente e realizar a montagem sobre uma lâmina microscópica e cobertura de vidro. As amostras foram coletadas principalmente dos seguintes ambientes: (i) água acumulada em ambiente residencial, ambientes com alta umidade e em plantas ornamentais; (ii) água coletada a partir de aquário com espécies de peixes, correspondendo um ecossistema de água doce.

Para o ambiente anteriormente descrito (i), dependendo do nível de limpidez da água, é possível encontrar pequenos Nematóides não-parasitas e algas-verde. Em amostras de aquário (ii), existe uma maior bio-diversidade de micro-organismos, podendo serem encontrados Rotíferas, Planárias, Protozoários, Euglenas, vermes de corpo achatados (*flatworms*), dentre outros. Durante o desenvolvimento da plataforma para vídeo holográfico, verificou-se repetidamente a presença destes mesmos micro-organismos nos ambientes mencionados. Embora da indisponibilidade de um microscópio óptico para confirmação dos espécimens, tal como realizado para a plataforma baseada em melhoramento de resolução, pode-se observar a reprodutibilidade dos resultados. Outro aspecto é que tais micro-organismos são comumente encontrados em ambientes com fluído, sendo bem descritos na literatura.

Nas próximas figuras serão demonstrados os resultados obtidos pela plataforma holográfica em vídeo proposta. Para cada figura apresentada, o vídeo correspondente ao sinal holográfico e decodificado faz-se disponível nos materiais suplementares desta tese. Os ví-



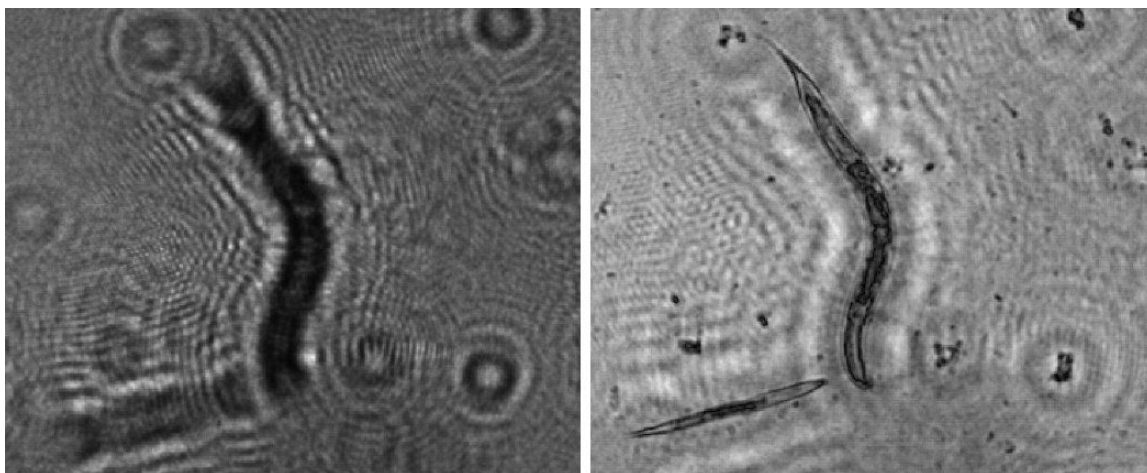


Figura 4.20: Amostras de fluido contendo nematóides em escala microscópica. Ao lado esquerdo, assinaturas holográficas dos vermes são apresentadas, ao lado direito, difração numérica considerando o sinal de amplitude.

deos holográficos são originais, sem codificação ou compressão a posteriori, onde pode ser verificada a taxa de amostragem e resolução de pixel correspondente ao FOV da captura.

#### 4.2.1 Ambiente Experimental de Amostras Biológicas I

Para o ambiente amostral (i), nematóides consistem em uma classe de animais multicelulares, sendo a mais numerosa do planeta, altamente abundante e com alta diversidade em ambientes aquáticos e terrestres, estando presentes praticamente em todo lugar [105]. Caracterizam-se por habitarem ambientes fluídicos, úmidos e mesmo no solo, onde milhares de vermes microscópicos podem ser encontrados. Desempenham papel fundamental na natureza, onde muitos nematóides são parasitas de outros insetos, plantas ou animais, e alimentam-se principalmente de bactérias, fungos e outros nematóides. Nematóides são estruturalmente simples, possuindo sistema digestivo, nervoso, excretor e reprodutivo, mas sem apresentar um sistema respiratório e circular. Na sua maioria, medem menos de 5 cm, com uma grande parcela destes sendo microscópicos. Na forma parasita, podem apresentar até alguns metros de comprimento, tal como os que afetam os sistemas digestivo de outros animais [106].

Assinatura holográfica e difração numérica correspondendo aos nematóides são demonstradas através da Figura 4.20, ao lado esquerdo e direito, respectivamente. O sinal

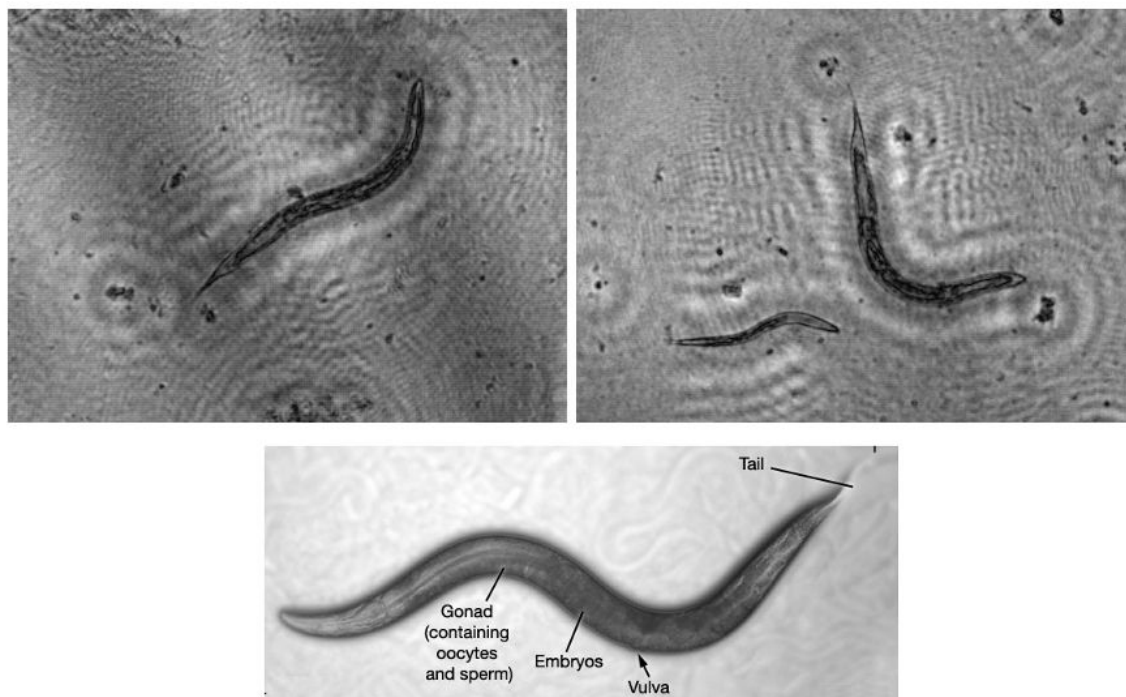


Figura 4.21: Nematóides em vídeo imageados através da plataforma holográfica proposta (superior). Microscopia de Nematóide hermafrodita adaptada de *WormAtlas* (inferior).

de amplitude é utilizado na difração numérica de maneira que os nematóides podem ser visualizados. É possível verificar a divisão do corpo dos nematóides em estruturas internas distintas.

Outros resultados do imageamento em vídeo de nematóides são apresentados também na Figura 4.21. Especificamente ao lado direito superior da figura, o nematóide de maior tamanho apresenta sexo hermafrodita, o que pode ser identificado principalmente pelas características de cauda e tamanho que os mesmos possuem. Na parte inferior da figura, a representação microscópica<sup>2</sup> de um típico nematóide hermafrodita é apresentado para efeitos visuais de comparação, em relação ao resultado obtido pela plataforma holográfica. Nematóides são em geral encontrados onde o fluido se encontra no ambiente por relativamente longos períodos de tempo, e principalmente onde a água não apresenta alto grau de limpidez. Pode-se também observar na figura a quantidade de fragmentos encontrados na amostra coletada. Os vídeos holográficos com amostras de Nematóides foram capturados utilizando a seguinte configuração:

<sup>2</sup><http://www.wormatlas.org/male/introduction/mainframe.htm>

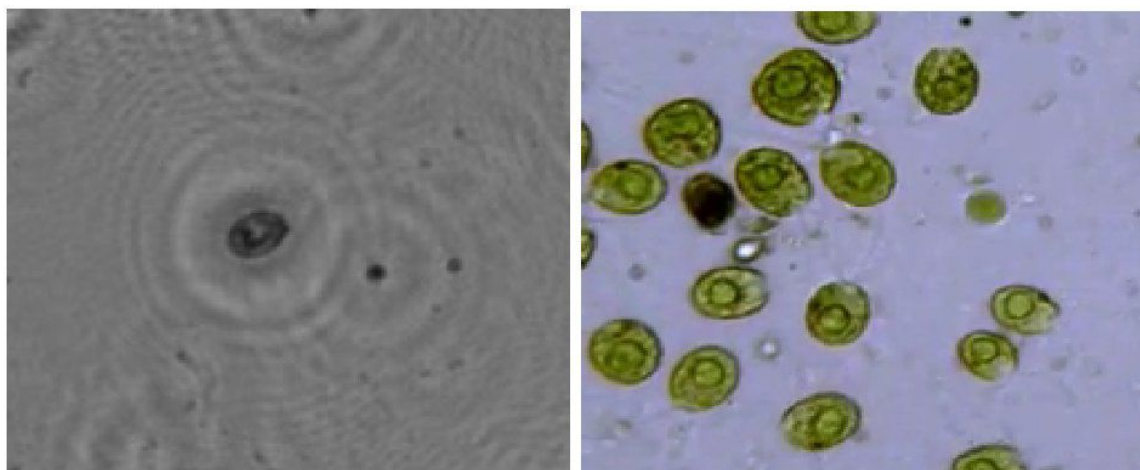


Figura 4.22: Amostras de fluido contendo algas-verde em escala microscópica. Lado esquerdo imagem de amplitude após difração numérica. Lado direito representação de uma imagem de microscopia.

- 01-hologram.avi: [MJPG] 640x644 24bpp 44.064 fps 116850.8 kbps (14264.0 kbyte/s)
- 02-hologram.avi: [MJPG] 776x724 24bpp 15.000 fps 46069.9 kbps (5623.8 kbyte/s)

Encontrados no mesmo tipo de ambiente, no entanto, com mais frequência onde o fluído é mais límpido, é possível visualizar pequenos unicelulares da classe das algas-verde, mais especificamente *Chlamydomonas* [107]. *Chlamydomona* é um tipo de alga-verde, consistindo de um organismo unicelular com flagelos, que pode ser encontrado em água parada ou mesmo solo úmido, na água doce ou salgada. Em geral, *chlamydomona* é comumente utilizada como um modelo de organismo na biologia molecular, genética e biogênese, e também em estudos de bio-acumulação de toxicidade em ambientes aquáticos. Outra função da utilização das *chlamydomona* é a análise de motilidade, uma vez que seus flagelos são o seu principal meio de locomoção.

*Chlamydomonas* podem ser visualizadas através da Figura 4.22, onde o resultado do vídeo holográfico no sinal de amplitude é apresentado ao lado esquerdo, e a representação microscópica ao lado direito. Similarmente, na ilustração da Figura 4.23 outros resultados da visualização de algas-verde são apresentadas na parte superior da figura. Ilustração das estruturas e dimensões do espécimen são demonstrados na parte inferior da figura<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>Representação microscópica adaptada de <http://www.ruf.rice.edu/bioslabs/studies/invertebrates/chlamydomonas.html>



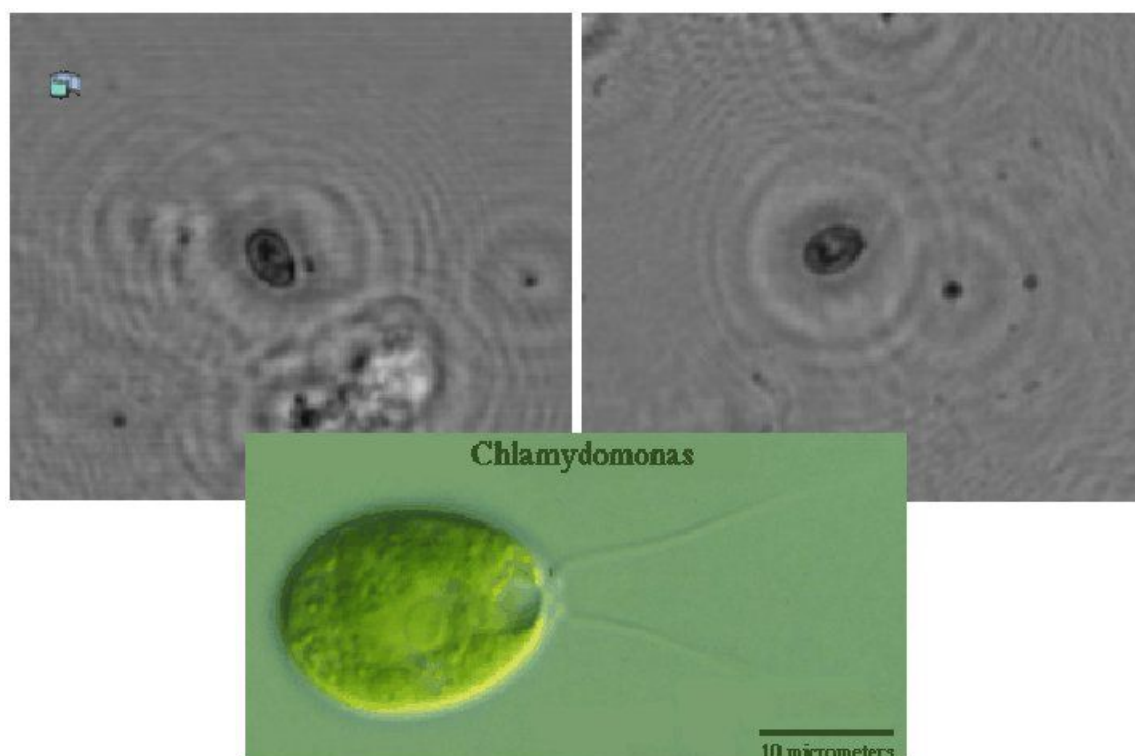


Figura 4.23: Amostras de fluido contendo algas-verde em escala microscópica. Parte superior, imagem de amplitude após difração numérica. Parte inferior representação de uma imagem de microscopia.

Vídeos holográficos correspondendo a algas verdes foram capturados com as seguintes configurações:

- 04-hologram.avi: [MJPG] 1056x880 24bpp 23.672 fps 136340.8 kbps (16643.2 kbyte/s)
- 05-hologram.avi: [MJPG] 976x800 24bpp 15.000 fps 60201.6 kbps (7348.8 kbyte/s)

#### 4.2.2 Ambiente Experimental de Amostras Biológicas II

Para o segundo ambiente analisado (ii), amostras foram coletadas a partir de um aquário ornamental contendo espécies de peixes de água doce. Neste tipo de ambiente é possível encontrar variados espécimens habitando e compartilhando o mesmo meio. Trata-se de um ambiente bastante propício para o desenvolvimento de vários micro-organismos, uma vez que existe abundante fonte de alimento.

Rotíferas são animais microscópicos aquáticos, e podem ser encontrados em ambientes de água doce parada (lagos) ou mesmo em córregos, ou no solo através do acúmulo de

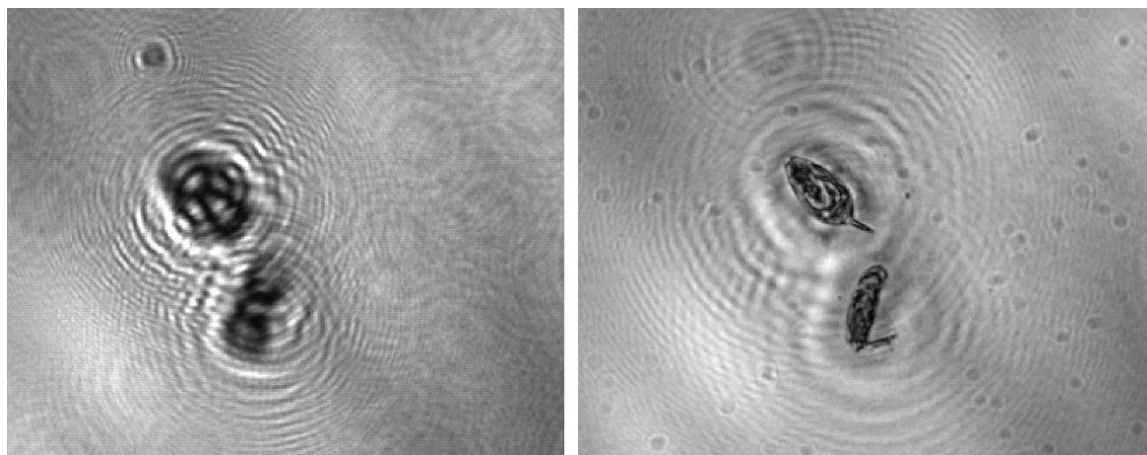


Figura 4.24: Amostras de fluido contendo Rotíferas em escala microscópica. Ao lado esquerdo, assinaturas holográficas são apresentadas, enquanto que ao lado direito, difração numérica considerando o sinal de amplitude é demonstrada.

água [108, 109]. Rotíferas são animais multi-celulares com cavidades corpóreas parcialmente cobertas por um mesodermo, e apresentam um órgão digestivo completo, incluindo boca e ânus. Maioria das espécies de rotíferas são comparáveis à escala dos protozoários unicelulares, medindo de 100 a 200  $\mu m$  de comprimento, e algumas espécies podem chegar até 500  $\mu m$ .

Assinatura holográfica e difração numérica correspondendo a visualização de Rotíferas são ilustradas através da Figura 4.24. Hologramas originais do processo de aquisição são demonstrados ao lado esquerdo, e o sinal de amplitude após difração numérica é apresentado ao lado direito. Pode ser verificado que na amostra apresentada neste exemplo podem ser visualizados duas rotíferas distintas em seu meio. Nos materiais suplementares é bastante interessante a visualização destes micro-organismos, onde os mesmos se encontram em movimentação livre no meio fluídico. Para o mesmo caso é possível verificar a movimentação das estruturas internas de uma das rotíferas, possivelmente se alimentando de partículas encontradas no ambiente, conforme material suplementar, vídeo “09-hologram.avi” e arquivos de difração numérica correspondentes. Outro caso interessante ocorre com o vídeo “04-hologram.avi”, onde outras espécies de protozoários podem ser visualizadas juntamente com Rotíferas.

Outros resultados do imageamento em vídeo de Rotíferas são apresentados através da Figura 4.25, onde os mesmos espécimens obtidos pela plataforma holográfica são apresen-

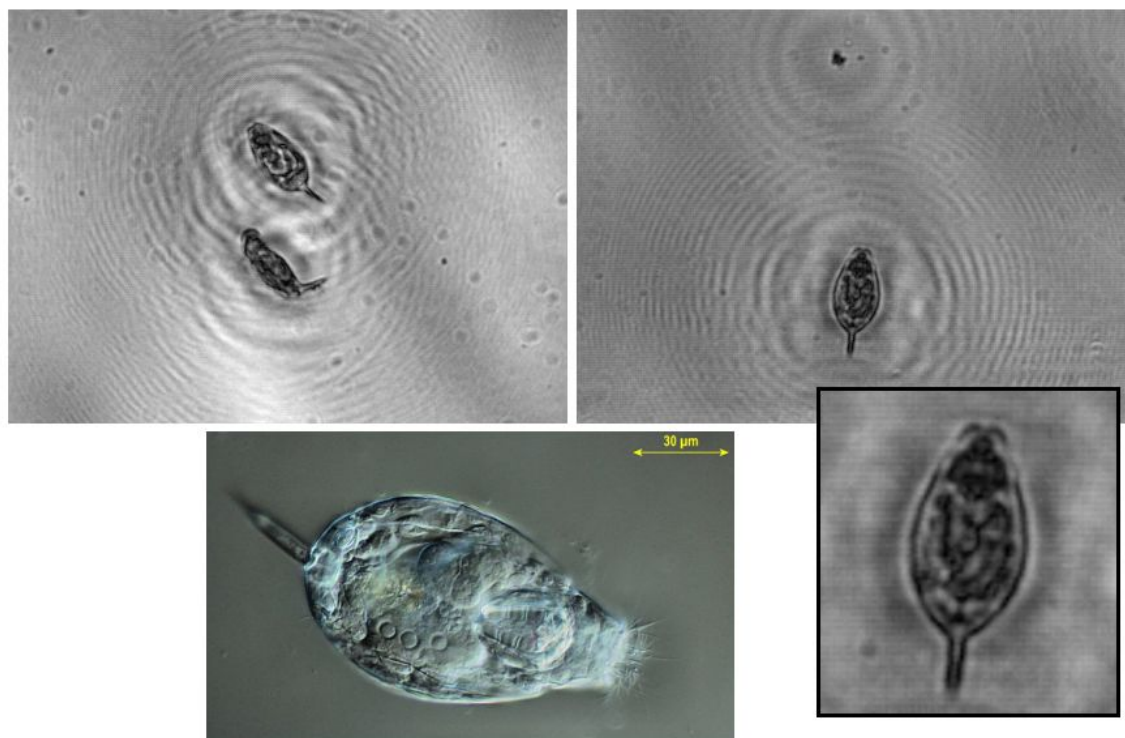


Figura 4.25: Rotíferas em vídeo holográfico, imageadas através da plataforma proposta (superior). Microscopia demonstrando morfologia de uma Rotífera é demonstrada (inferior).

tados na parte superior. Na parte inferior da figura, uma ilustração microscópica<sup>4</sup> de uma Rotífera é apresentada para efeitos de comparação. Os vídeos holográficos apresentados nos materiais suplementares apresentam a seguinte configuração:

- 04-hologram.avi: [MJPG] 864x704 24bpp 34.066 fps 105061.9 kbps (12824.9 kbyte/s)
- 09-hologram.avi: [MJPG] 864x692 24bpp 34.424 fps 110326.9 kbps (13467.6 kbyte/s)

Outra espécie possível de ser visualizada na plataforma holográfica são os vermes de corpo achatado da classe dos platelmintos, um sub-reino dos invertebrados [110]. Platelminhos podem ser frequentemente encontrados em reservatórios de água doce, e variam de tamanho de microscópicos a visíveis com o auxílio de lentes de aumento. Platelminhos apresentam o corpo achatado possibilitando assim a visualização da sua anatomia interna, bem como as partes constituintes do sistema nervoso, dependendo da capacidade de resolução do microscópio utilizado. Dentre o grupo dos platelmintos, alguns destes

<sup>4</sup>Adaptado de <http://www.photomacrography.net/>

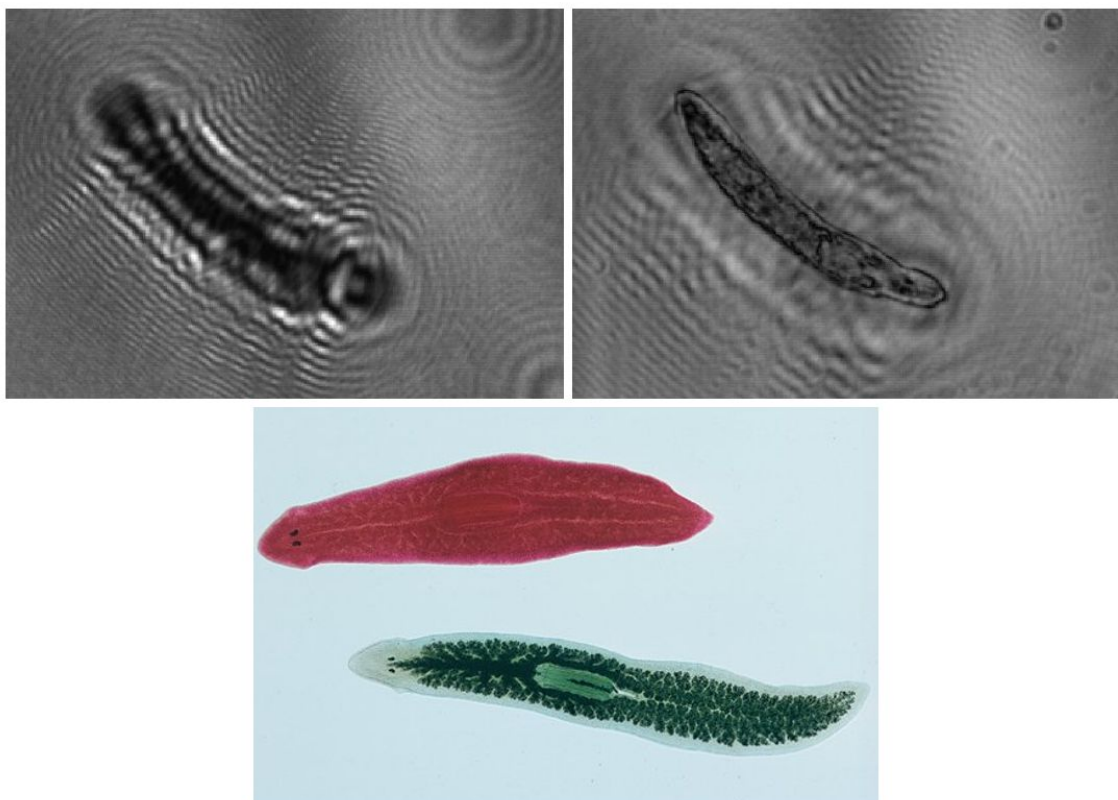


Figura 4.26: Visualização de platelmintos (planária) pela plataforma holográfica proposta. Lado esquerdo e direito superior, holograma original e difração numérica no sinal de amplitude, respectivamente. Inferior, representação microscópica de um platelminto.

são classificados como não-parasitas, tal como as planárias, e outros parasitas causadores de doenças como a *Schistosomiasis*, através da *Taenia Saginata* que é extremamente nociva ao ser humano. De uma forma geral, grande parte dos platelmintos encontrados livremente na natureza são considerados predadores, e apresentam tamanho variando de algumas centenas de micrômetros até alguns centímetros, dependendo da espécie. Especificamente as planárias apresentam um comportamento regenerativo bastante interessante objeto de estudo na biologia, a qual pode se regenerar e gerar um novo indivíduo completo a partir de partes de seu corpo.

Exemplo da visualização de platelmintos na plataforma holográfica proposta (possivelmente uma planária) são demonstrados através da Figura 4.26. Ao lado superior esquerdo é possível verificar o holograma de um platelminto, e seu sinal de amplitude ao lado superior direito, respectivamente. Por apresentar corpo alongado, é possível verificar alguma similaridade do sinal holográfico com o sinal anteriormente apresentado na Figura

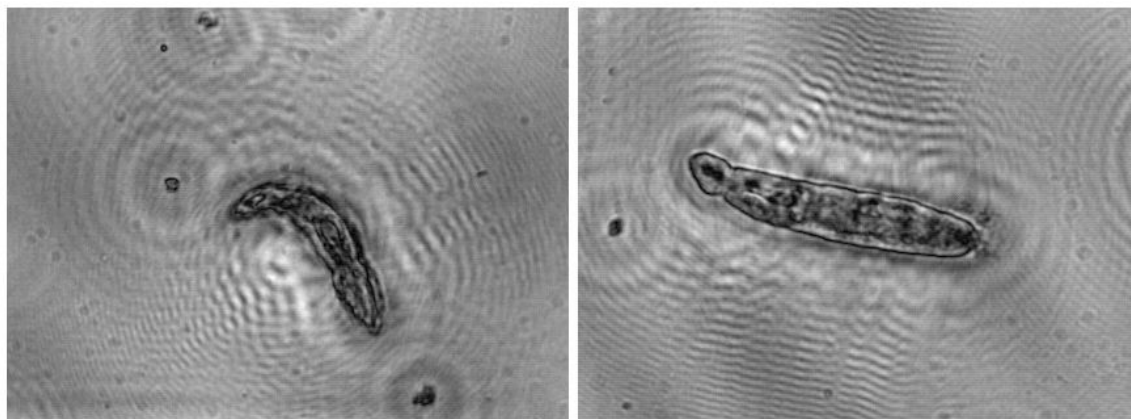


Figura 4.27: Visualização de platelmintos em movimentação livre no meio fluídico, capturados através da plataforma holográfica proposta.

4.20, onde nematóides são demonstrados. Na figura onde o sinal de amplitude é demonstrado, é possível verificar algumas estruturas internas do platelminto, bem como no vídeo apresentado no material suplementar, onde detalhes da movimentação do espécimen são verificados. Na parte inferior da Figura 4.26 é demonstrada a representação de microscopia para uma planária e suas estruturas internas, adaptada de <http://www.carolina.com/>.

Outros exemplos de planárias visualizadas através da plataforma holográfica em vídeo apresentada neste trabalho, são apresentados na Figura 4.27. Para os resultados apresentados através das figuras previamente demonstradas, os seguintes vídeos holográficos foram obtidos:

- 05-hologram.avi: [MJPG] 768x628 24bpp 40.698 fps 93228.4 kbps (11380.4 kbyte/s)
- 08-hologram.avi: [MJPG] 720x820 24bpp 33.573 fps 93942.6 kbps (11467.6 kbyte/s)
- 11-hologram.avi: [MJPG] 896x868 24bpp 27.974 fps 112810.0 kbps (13770.7 kbyte/s)

Da classe dos protozoários, outro espécimen verificado é a *Vorticella*, grupo que pode ser classificado em outras 16 espécies [111]. *Vorticella* é um unicelular que habita principalmente a água doce, e apresenta o formato de um sino invertido ciliado. Sua movimentação é realizada através de uma haste, que quando estimulada realiza contrações na forma de espiral [112]. Apresenta na ponta da haste um pedúnculo, que serve de fixação do protozoário em substratos, e movimenta-se como um animal. Com certa frequência

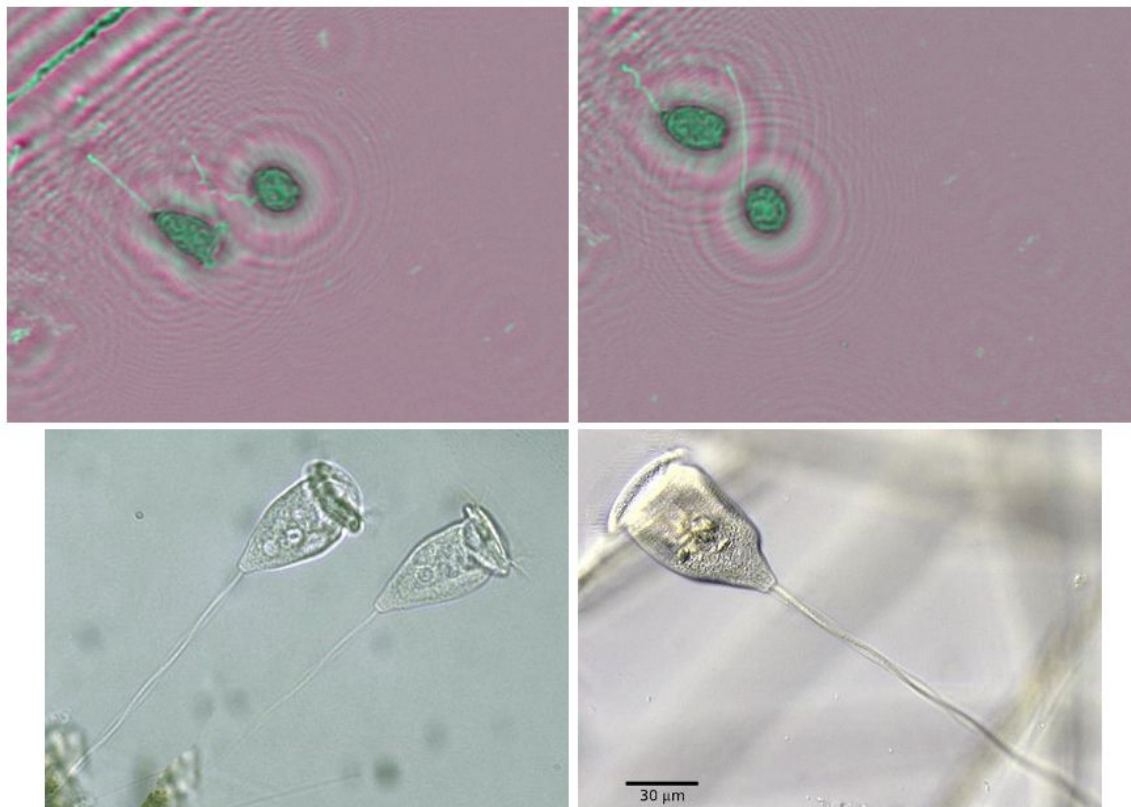


Figura 4.28: Protozoários observados através da plataforma holográfica em vídeo proposta. Sinal multi-dimensional  $C_{rgb}$  é utilizado na parte superior. Confirmação microscópica é demonstrada nas figuras da parte inferior.

este espécimen é encontrado em grupos de indivíduos como colônias, embora não possam ser considerados colônias uma vez que cada indivíduo apresenta sua própria haste. Desconsiderando o comprimento da haste, suas dimensões podem variar de  $50 \mu m$  de comprimento por  $30 \mu m$  em largura.

A visualização de *Vorticella* através da plataforma holográfica em vídeo é demonstrada através da Figura 4.28. Na parte superior, o sinal de composição  $C_{rgb}$  é apresentado, uma vez que a visualização dos detalhes de movimentação haste são melhores perceptíveis com a utilização da imagem multi-dimensional. Na parte inferior, imagens microscópicas do espécimen são apresentadas<sup>5</sup>, onde um alto fator de ampliação é utilizado para obtenção de uma imagem de alta resolução.

A observação do vídeo holográfico referente a ilustração de *Vorticella* (4.28) apresenta detalhes muito interessantes a respeito da movimentação e as contrações realizadas,

<sup>5</sup>Adaptadas de <http://imgarcade.com/1/vorticella-400x/>



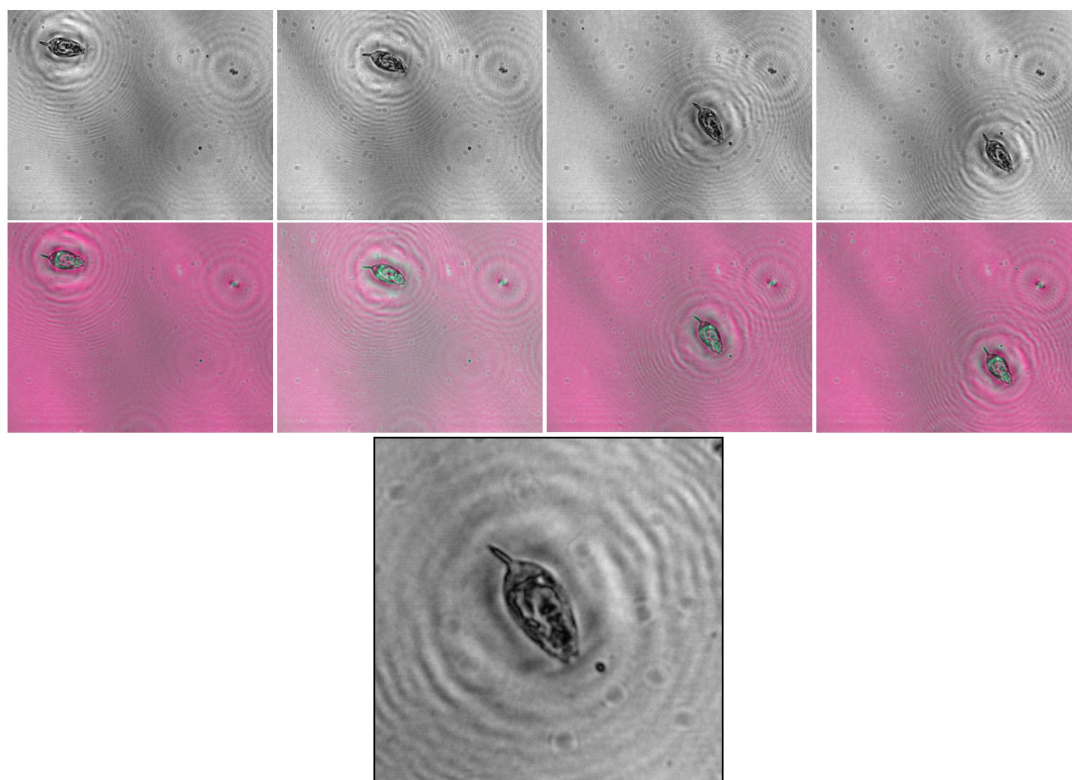


Figura 4.29: Movimentação de rotíferas em vídeo holográfico, em ambiente livre no meio fluídico.

conforme descrito na literatura [112]. Durante as contrações, é possível ver em detalhes a maneira com que a haste contrai-se em forma de espiral, acumulando energia e projetando o protozoário ao longo da haste. Para os resultados apresentados os seguintes vídeos holográficos e configurações foram obtidos:

- 02-hologram.avi: [MJPG] 656x456 24bpp 66.662 fps 95959.9 kbps (11713.8 kbyte/s)
- 03-hologram.avi: [MJPG] 872x668 24bpp 10.000 fps 26935.9 kbps (3288.1 kbyte/s)

Os resultados apresentados para o processamento em vídeo holográfico, apesar de experimentais, demonstram uma grande capacidade e potencial de desenvolvimento de aplicações biológicas para os mais diversos propósitos. A reprodutibilidade dos resultados para amostras de micro-organismos em água demonstram que o protótipo se encontra bastante robusto e estável para o imageamento *in-situ*, conforme pode ser verificado através dos vídeos apresentados nos materiais suplementares. Nestes vídeos várias amostras de micro-organismos são demonstrados *in-situ*, onde é possível a visualização de sua movimentação típica no meio fluídico. Para o caso de amostras de nematóides, por exemplo,

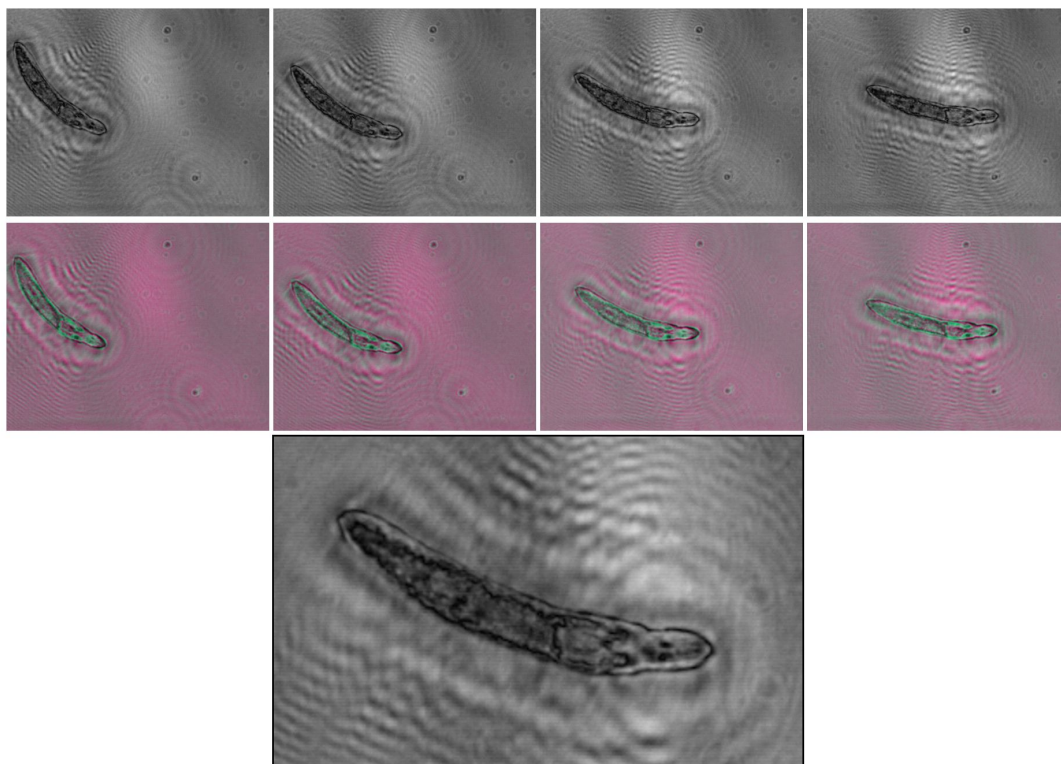


Figura 4.30: Movimentação de platelmintos em vídeo holográfico, em ambiente livre no meio flúídico.

os mesmos podem ser facilmente encontrados abundantemente em visualizados em ambientes variados, tal como solo úmido.

Pode ser verificado que a plataforma holográfica proposta nesta tese apresenta como enfoque o problema de formação de imagem e mecanismos de aquisição considerando um equipamento portátil e miniaturizado, com relativamente baixo custo de desenvolvimento. Aplicações futuras envolvendo o processamento de vídeo holográfico apresentarão como foco a integração de algoritmos computacionais para o processamento digital de imagens, reconhecimento de padrões, e da própria visão computacional. Exemplos demonstrados através das Figuras 4.29 e Figura 4.30 são casos típicos onde algoritmos de rastreamento de trajetórias e análise comportamental podem ser integrados, como medidores de anomalias no eco-sistema destas espécies. Outras aplicações para o caso de nematóides inclui a análise do profile bio-mecânico como uma ferramenta quantitativa para a quantificação da locomoção de *C.Elegans*.



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÃO E DISCUSSÕES

Tecnologias de imageamento holográfico sem o uso de lentes demonstram-se bastante apropriadas para o desenvolvimento de soluções miniaturizadas em *Point-of-Care*, ou mesmo como ferramentas de *Point-of-Need* para propósitos gerais de inspeção e imageamento em micro-escala. Devido a sua fácil integração e compartilhamento com os já existentes recursos de hardware, o imageamento holográfico sem lentes possibilita a automação de processos de tomada de decisão para a solução de problemas do mundo real.

Nesta tese de doutorado foi demonstrado o desenvolvimento de tecnologias para o imageamento holográfico sem a utilização de lentes, com enfoque na visualização de espécimens em escala de micrômetros. Inicialmente as pesquisas foram direcionadas somente para o imageamento de células humanas reprodutoras masculinas, utilizando os recursos de melhoramento de resolução holográfica, por meio de múltiplas observações da cena. Ao retorno do doutoramento Sanduíche, com a continuidade dos estudos na holografia digital *inline*, uma segunda plataforma foi idealizada, especificamente designada para a holografia em vídeo.

Para o primeiro protótipo, uma técnica de super-resolução especificamente designada para melhoramento de resolução holográfica foi desenvolvida. Pela utilização de modelos variacionais, mais especificamente baseados na energia funcional de Mumford-Shah, a minimização de uma função objetiva é realizada para obtenção do alinhamento otimizado entre as imagens de um conjunto de baixa-resolução. A equação de energia, composta de dois termos penalizadores, objetiva manter o alinhamento inicial realizado por métodos de registro baseados em características, e maximizar a propagação do sinal holográfico, importante para a difração numérica do sinal. O protótipo de hardware também é baseado na utilização de uma única fonte de iluminação, onde ocorre o deslocamento do topo da plataforma de maneira arbitrária.

Os resultados obtidos por esta abordagem possibilitaram a visualização de estruturas microscópicas na ordem de  $\approx 1\mu m$  em uma FOV de  $\approx 30mm^2$ . Os resultados obtidos demonstram a efetividade da plataforma proposta, onde a visualização de estruturas bastante pequenas podem ser verificadas na plataforma holográfica. De um ponto de vista computacional, a abordagem em *multi-frame* para computação da informação de *sub-pixel* pode ser utilizada para circunver limites físicos de hardware, pela recuperação da informação faltante pela utilização de múltiplas observações da mesma cena ou amostra. Outro efeito é a supressão do nível de ruído nos hologramas obtidos, o que é realizado sem a alteração ou adição de novos componentes de hardware. Não obstante, a FOV disponível na plataforma proposta, mesmo para *single-shots*, é consideravelmente muito maior que a capacidade dos microscópios ópticos convencionais. No entanto, a plataforma holográfica para melhoramento de resolução exige que não haja movimentação no meio fluídico, logo apenas amostras estáticas podem ser imageadas. Em relação às abordagens estado-da-arte, o FOV utilizado é também superior, possibilitando a captura do sinal biológico em um amplo campo de visualização.

A segunda plataforma holográfica apresenta como enfoque o imageamento 4D dinâmico de espécimens, sob certa penalização da resolução, uma vez que somente *frames* são capturados e decodificados sequencialmente. No entanto, as aplicações de uma plataforma holográfica em vídeo são inúmeras, onde amostras *in-situ* de diversas naturezas podem ser visualizadas. Além de análise quantitativa, tal como o valor absoluto do número de espécimens em uma amostra, análise da qualidade dos micro-organismos pode ser futuramente realizada, como um indicativo de anormalidades e contaminação dos ambientes fluídicos. Os resultados experimentais para este tipo de plataforma demonstram a capacidade de capturar *frames* a uma taxa de amostragem máxima de aproximadamente 65 *fps*, onde detalhes interessantes da movimentação dos espécimens podem ser verificados. Embora, dependendo da aplicação, em torno de 15 *fps* já provê informação suficiente para a visualização do comportamento dos espécimens.

Sensores de imagem utilizando a tecnologia CMOS apresentam notáveis vantagens quando comparados com os sensores por CCD, comercialmente disponíveis. Primeira-

mente, o custo de um sensor por CMOS é bastante inferior e o tamanho e requerimentos de energia são bastante reduzidos. Por exemplo, a plataforma proposta utiliza um sensor de imagem por CMOS onde ambas alimentação e comunicação operam via conexão USB. Desta forma, plataformas com tecnologia de imageamento por CMOS podem ser facilmente miniaturizadas em dispositivos portáteis de imageamento. Outro fator é em relação aos aspectos de aquecimento existente nos sensores por CCD, o qual é bastante reduzido na tecnologia por CMOS. O aquecimento é um fator impeditivo para várias aplicações biológicas, onde a amostra ou mesmo micro-organismos são posicionados diretamente ou a distâncias muito próximas do sensor de imagem.

Para trabalhos futuros, melhoramentos para a plataforma proposta deverão incrementar a sua eficiência e efetividade no imageamento de deslocamento controlado, e reduzir possíveis efeitos de distorção durante o processo de alinhamento rápido das imagens. Da mesma forma, com o uso de deslocamentos controlados e constantes a cada utilização, uma matriz fixa de deslocamento pode ser embarcada, eliminando várias etapas de alinhamento atualmente requeridas pela plataforma. Um segundo aspecto a ser tratado para melhoramento da informação visual é o problema da imagem gêmea, onde vários métodos numéricos podem ser utilizados para este fim.

Como pode ser verificado, o enfoque inicial para o desenvolvimento das plataformas holográficas deu-se em torno do problema de formação de imagem, convertida a partir de hologramas. A partir deste ponto, uma série de trabalhos podem ser desenvolvidos, tanto em termos computacionais (hardware e software), análise inteligente de imagem e sistemas diagnósticos, quanto no contexto biológico. Algumas questões relevantes de pesquisa em relação ao trabalho apresentado nesta tese são levantados:

- Foram utilizadas 49 imagens a um deslocamento irregular. Baseado em uma plataforma regular automatizada de deslocamento, quantas imagens podem fornecer a qualidade de imageamento esperada para visualização das mesmas estruturas;
- Faz-se necessária a validação consistente em relação a métodos de super-resolução. No presente trabalho, buscou-se otimizar o alinhamento entre imagens de um conjunto de baixa-resolução, utilizando um *framework* conhecido para realizar a mini-

mização de uma função objetiva de custo. Embora não haja métodos de super-resolução respecificamente designados para holografia, uma análise com os métodos tradicionais de super-resolução é interessante de ser realizada;

- Embora complexo de ser realizado e ser uma área bastante recente, a análise comparativa em relação à outras plataformas holográficas é necessário. No entanto, até o presente momento a plataforma que mais se assemelha ao apresentado nesta tese com foco em super-resolução é descrita por Dr.Ozcan [46, 49]. A presente plataforma, no entanto, utiliza um *array* de LEDs para realizar o deslocamento da fonte luminosa, e métodos de reconstrução iterativos. Na plataforma proposta, a iluminação é realizada com uma única fonte, deslocando-se sobre a base da plataforma. Divergência também ocorre na reconstrução do sinal, realizada por modelos variacionais de energia funcional, e difração numérica por Fresnel;
- Auto-foco é necessário para a reconstrução total volumétrica, bem como visualização 4D das amostras no ambiente fluídico;

Além dos resultados experimentais apresentados nesta tese de doutorado, diversos experimentos foram realizados ao longo do desenvolvimento da plataforma baseada em múltiplos *frames*. Células reprodutoras masculinas foi um caso interessante desde o início da plataforma, onde os hologramas ainda estavam sendo decodificados pelos métodos de difração numérica, logo apresentando uma validação mais robusta. Amostras em microfluídica contendo plaquetas, na ordem de 2 a 3  $\mu m$  foram também analisadas. Células cancerígenas e células normais foram também visualizadas pela plataforma proposta, onde houve total correlação com a confirmação microscópica.

Outros testes ocorreram na análise celular para a contagem e identificação de Neutrófilos. Embora a célula apresente em torno de 10  $\mu m$ , ou seja, maior que amostras de células reprodutoras masculinas apresentadas, a plataforma não se demonstrou eficiente para análise celular, possivelmente devido aos aspectos de iluminação, ou densidade da amostra analisada. Análises preliminares foram também realizadas, porém sem conclusão, com células infectadas por HIV. Para este último caso, está sendo buscado alguma parti-

cularidade no sinal holográfico sem realizar a difração numérica, que possibilite diferenciar células normais, das infectadas por HIV.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] D Gabor. Microscopy by reconstructed wave fronts: Ii. *Proceedings of the Physical Society. Section B*, 64(6):449, 1951.
- [2] D. Gabor. A new microscopic principle. *Nature*, 161(4098):777–778, 1948.
- [3] ShuQi Wang, Feng Xu, and Utkan Demirci. "advances in developing hiv-1 viral load assays for resource-limited settings.". *Biotechnol Adv*, 28(6):770–81, 2010.
- [4] ShuQi Wang, Fatih Inci, Gennaro De Libero, Amit Singhal, and Utkan Demirci. Point-of-care assays for tuberculosis: Role of nanotechnology/microfluidics. *Biotechnology Advances*, 31(4):438 – 449, 2013.
- [5] Savas Tasoglu, Umut Atakan Gurkan, ShuQi Wang, and Utkan Demirci. Manipulating biological agents and cells in micro-scale volumes for applications in medicine. *Chem. Soc. Rev.*, 42:5788–5808, 2013.
- [6] Won Gu Lee, Yun-Gon Kim, Bong Geun Chung, Utkan Demirci, and Ali Khamdemosseini. Nano/microfluidics for diagnosis of infectious diseases in developing countries. *Advanced drug delivery reviews*, 62(4):449–457, 2010.
- [7] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, George M. Whitesides, and Emanuel Carriho. Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical Chemistry*, 82(1):3–10, 2010.
- [8] Xiaole Mao and Tony Jun Huang. Microfluidic diagnostics for the developing world. *Lab Chip*, 12:1412–1416, 2012.
- [9] ShuQi Wang, Fatih Inci, Tafadzwa L Chaunzwa, Ajay Ramanujam, Aishwarya Vasudevan, Sathya Subramanian, Alexander Chi Fai Ip, Banupriya Sridharan, Umut Atakan Gurkan, and Utkan Demirci. Portable microfluidic chip for detec-

- tion of escherichia coli in produce and blood. *Int J Nanomedicine*, 7:2591–600, 2012.
- [10] ShuQi Wang, Matin Esfahani, Umut A. Gurkan, Fatih Inci, Daniel R. Kuritzkes, and Utkan Demirci. Efficient on-chip isolation of hiv subtypes. *Lab Chip*, 12:1508–1515, 2012.
- [11] Hadi Shafiee, Muntasir Jahangir, Fatih Inci, Shuqi Wang, Remington B M Wilenbrecht, Francoise F Giguel, Athe M N Tsibris, Daniel R Kuritzkes, and Utkan Demirci. Acute on-chip hiv detection through label-free electrical sensing of viral nano-lysate. *Small*, 2013.
- [12] F Inci, O Tokel, S Wang, UA Gurkan, S Tasoglu, DR Kuritzkes, and U Demirci. Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood. *ACS nano*, 2013 May 20 2013.
- [13] Umut Atakan Gurkan, Sangjun Moon, Hikmet Geckil, Feng Xu, Shuqi Wang, Tian Jian Lu, and Utkan Demirci. Miniaturized lensless imaging systems for cell and microorganism visualization in point-of-care testing. *Biotechnol J*, 6(2):138–49, 2011.
- [14] Aydogan Ozcan and Utkan Demirci. Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip. *Lab Chip*, 8(1):98–106, 2008.
- [15] SangJun Moon, Umut Atakan Gurkan, Jeffrey Blander, Wafaie W Fawzi, Said Aboud, Ferdinand Mugusi, Daniel R Kuritzkes, and Utkan Demirci. Enumeration of cd4+ t-cells using a portable microchip count platform in tanzanian hiv-infected patients. *PLoS One*, 6(7):e21409, 2011.
- [16] Sungkyu Seo, Ting-Wei Su, Derek K. Tseng, Anthony Erlinger, and Aydogan Ozcan. Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics. *Lab Chip*, 9:777–787, 2009.

- [17] Onur Mudanyali, Derek Tseng, Chulwoo Oh, Serhan O. Isikman, Ikbale Sencan, Waheb Bishara, Cetin Oztoprak, Sungkyu Seo, Bahar Khademhosseini, and Aydogan Ozcan. Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications. *Lab Chip*, 10:1417–1428, 2010.
- [18] C. Quan, W. Chen, and C.J. Tay. Numerical reconstruction in in-line digital holography by translation of {CCD} position and gradient operator method. *Optics Communications*, 284(12):2767 – 2770, 2011.
- [19] Jorge Garcia-Sucerquia, Wenbo Xu, Stephan K. Jericho, Peter Klages, Manfred H. Jericho, and H. Jurgen Kreuzer. Digital in-line holographic microscopy. *Appl. Opt.*, 45(5):836–850, Feb 2006.
- [20] J. W. Goodman. Digital image formation from electronically detected holograms, 1967.
- [21] Thomas Brox. *From Pixels to Regions: Partial Differential Equations in Image Analysis*. PhD thesis, Mathematical Image Analysis Group, Department of Mathematics and Computer Science, Saarland University, Germany, April 2005.
- [22] C. Lopez-Molina, M. Galar, H. Bustince, and B. De Baets. On the impact of anisotropic diffusion on edge detection. *Pattern Recognition*, 47(1):270 – 281, 2014.
- [23] Antonio Carlos Sobieranski, Eros Comunello, and Aldo von Wangenheim. Learning a nonlinear distance metric for supervised region-merging image segmentation. *Comput. Vis. Image Underst.*, 115(2):127–139, February 2011.
- [24] Gengjian Xue, Jun Sun, and Li Song. Background subtraction based on phase feature and distance transform. *Pattern Recognition Letters*, 33(12):1601 – 1613, 2012.
- [25] Changyong Yoon, Minkyu Cheon, and Mignon Park. Object tracking from image sequences using adaptive models in fuzzy particle filter. *Information Sciences*, 253(0):74 – 99, 2013.



- [26] Ting Rui, Qi Zhang, You Zhou, and Jianchun Xing. Object tracking using particle filter in the wavelet subspace. *Neurocomputing*, 119(0):125 – 130, 2013. Intelligent Processing Techniques for Semantic-based Image and Video Retrieval.
- [27] Sang Bok B. Kim, Hojae Bae, Kyo-In I. Koo, Mehmet R. Dokmeci, Aydogan Ozcan, and Ali Khademhosseini. Lens-free imaging for biological applications. *Journal of laboratory automation*, 17(1):43–49, February 2012.
- [28] Myung K. Kim. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy*, pages 018005–018005–50, 2010.
- [29] Serhan O. Isikman, Waheb Bishara, and Aydogan Ozcan. Partially coherent lensfree tomographic microscopy. *Appl. Opt.*, 50(34):H253–H264, Dec 2011.
- [30] Vicente Micó, Zeev Zalevsky, and Javier García. Edge processing by synthetic aperture superresolution in digital holographic microscopy. *3D Research*, 2(1), 2011.
- [31] Anwar Hussain and Asloob A. Mudassar. Holography based super resolution. *Optics Communications*, 285(9):2303 – 2310, 2012.
- [32] A. Hussain, J. Martínez, and J. Campos. Holographic superresolution using spatial light modulator. *Journal of the European Optical Society - Rapid publications*, 8(0), 2013.
- [33] V. Bianco, M. Paturzo, O. Gennari, A. Finizio, and P. Ferraro. Imaging through scattering microfluidic channels by digital holography for information recovery in lab on chip. *Opt. Express*, 21(20):23985–23996, Oct 2013.
- [34] C. Sheppard. Fundamentals of superresolution. *Micron*, 38(2):165–169, February 2007.
- [35] Liangpei Zhang, Hongyan Zhang, Huanfeng Shen, and Pingxiang Li. A super-resolution reconstruction algorithm for surveillance images. *Signal Processing*, 90(3):848 – 859, 2010.

- [36] Daniel Glasner, Shai Bagon, and Michal Irani. Super-resolution from a single image. In *ICCV*, 2009.
- [37] Jinming Li, Weiguo Gong, Weihong Li, and Feiyu Pan. Single-image super-resolution reconstruction based on global non-zero gradient penalty and non-local laplacian sparse coding. *Digital Signal Processing*, 2013.
- [38] Sandra Van Aert, Dirk Van Dyck, and Arnold J. den Dekker. Resolution of coherent and incoherent imaging systems reconsidered - classical criteria and a statistical alternative. *Opt. Express*, 14(9):3830–3839, May 2006.
- [39] L. C. Pickup. *Machine Learning in Multi-frame Image Super-resolution*. PhD thesis, University of Oxford, February 2008.
- [40] Xuelong Li, Yanting Hu, Xinbo Gao, Dacheng Tao, and Beijia Ning. A multi-frame image super-resolution method. *Signal Process.*, 90(2):405–414, February 2010.
- [41] Beijia Ning and Xinbo Gao. Multi-frame image super-resolution reconstruction using sparse co-occurrence prior and sub-pixel registration. *Neurocomputing*, 117(0):128 – 137, 2013.
- [42] Guoan Zheng, Seung Ah Lee, Yaron Antebi, Michael B. Elowitz, and Changhuei Yang. The epetri dish, an on-chip cell imaging platform based on subpixel perspective sweeping microscopy (spsm). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011.
- [43] Mei Yan, Xiwei Huang, Qixiang Jia, Revanth Nadipalli, Tongxi Wang, Yang Shang, Hao Yu, Minkyu Je, and Kiatseng Yeo. High-speed cmos image sensor for high-throughput lensless microfluidic imaging system. *Proc. SPIE*, 8298:829804–829804–12, 2012.
- [44] Xiwei Huang, Jinhong Guo, Xiaolong Wang, Mei Yan, Yuejun Kang, and Hao Yu.

- [45] Waheb Bishara, Ting-Wei Su, Ahmet F. Coskun, and Aydogan Ozcan. Lensfree on-chip microscopy over a wide field-of-view using pixel super-resolution. *Opt. Express*, 18(11):11181–11191, May 2010.
- [46] Waheb Bishara, Uzair Sikora, Onur Mudanyali, Ting-Wei Su, Oguzhan Yaglidere, Shirley Luckhart, and Aydogan Ozcan. Portable and cost-effective pixel super-resolution on-chip microscope for telemedicine applications. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011:8207–10, 2011.
- [47] Ting-Wei Su, Serhan O Isikman, Waheb Bishara, Derek Tseng, Anthony Erlinger, and Aydogan Ozcan.
- [48] Serhan O. Isikman, Waheb Bishara, Sam Mavandadi, Frank W. Yu, Steve Feng, Randy Lau, and Aydogan Ozcan. Lens-free optical tomographic microscope with a large imaging volume on a chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18):7296–7301, 2011.
- [49] Ting-Wei W. Su, Liang Xue, and Aydogan Ozcan. High-throughput lensfree 3D tracking of human sperms reveals rare statistics of helical trajectories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40):16018–16022, October 2012.
- [50] Ting-Wei Su, Inkyum Choi, Jiawen Feng, Calvin Huang, Euan McLeod, and Aydogan Ozcan.
- [51] L. E. Carvalho, S. L. Mantelli Neto, Aldo von Wangenheim, Antonio Carlos Sobieranski, Leandro Coser, and Eros Comunello. Hybrid color segmentation method using a customized nonlinear similarity function. *Int. J. Image Graphics*, 14(1-2), 2014.
- [52] Antonio Carlos Sobieranski, Vito F. Chiarella, Eduardo Barreto-Alexandre, Rodrigo Linhares, Eros Comunello, and Aldo von Wangenheim. Color skin segmentation based on non-linear distance metrics. In *Progress in Pattern Recognition, Image*

- Analysis, Computer Vision, and Applications - 19th Iberoamerican Congress, CIARP 2014, Puerto Vallarta, Mexico, November 2-5, 2014. Proceedings*, pages 143–150, 2014.
- [53] Antonio Carlos Sobieranski, Fatih Inci, H. Cumhur Tekin, Eros Comunello, Aldo von Wangenheim, and Utkan Demirci. Portable digital in-line holography platform for sperm cell visualization and quantification. In *27th SIBGRAPI Conference on Graphics, Patterns and Images, SIBGRAPI 2014, Rio de Janeiro, Brazil, August 27-30, 2014*, pages 274–281, 2014.
- [54] Antonio Carlos Sobieranski, Rodrigo Linhares, Eros Comunello, and Aldo von Wangenheim. A fast gabor filter approach for multi-channel texture feature discrimination. In *Progress in Pattern Recognition, Image Analysis, Computer Vision, and Applications - 19th Iberoamerican Congress, CIARP 2014, Puerto Vallarta, Mexico, November 2-5, 2014. Proceedings*, pages 135–142, 2014.
- [55] U. Schnars and W. Jüptner. Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction. *Appl. Opt.*, 33(2):179–181, January 1994.
- [56] Etienne Cuche, Patrick Poscio, and Christian D. Depeursinge. Optical tomography at the microscopic scale by means of a numerical low-coherence holographic technique, 1996.
- [57] Tomoyoshi Shimobaba, Jiantong Weng, Takahiro Sakurai, Naohisa Okada, Takashi Nishitsuji, Naoki Takada, Atsushi Shiraki, Nobuyuki Masuda, and Tomoyoshi Ito. Computational wave optics library for C++: CWO++ library. *j-COMP-PHYS-COMM*, 183(5):1124–1138, May 2012.
- [58] Karen M. Molony, Bryan M. Hennelly, Damien P. Kelly, and Thomas J. Naughton. Reconstruction algorithms applied to in-line gabor digital holographic microscopy. *Optics Communications*, 283(6):903 – 909, 2010.
- [59] M.K. Kim. *Digital Holographic Microscopy: Principles, Techniques, and Applications*. Springer Series in Optical Sciences. Springer, 2011.

- [60] Naseem Akhter, Gihyeon Min, Ju Wan Kim, and Byeong Ha Lee. A comparative study of reconstruction algorithms in digital holography. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 124(17):2955 – 2958, 2013.
- [61] Weijuan Qu, De'an Liu, Ya'nan Zhi, and Liren Liu. Digital holographic interferometry and the angular spectrum method applied to measuring the domain inversion in ferroelectric crystal. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(5):480, 2007.
- [62] Lingfeng Yu and Myung K. Kim. Pixel resolution control in numerical reconstruction of digital holography. *Opt. Lett.*, 31(7):897–899, Apr 2006.
- [63] D.E. Ilea and P.F. Whelan. Image segmentation based on the integration of colour-texture descriptors—a review. *Pattern Recognition*, 44(10–11):2479 – 2501, 2011.
- [64] J. G. Daugman. Uncertainty relation for resolution in space, spatial frequency, and orientation optimized by two-dimensional visual cortical filters. *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision*, 2(7):1160–1169, 1985.
- [65] J. Malik and P. Perona. Preattentive texture discrimination with early vision mechanisms. *Journal Optical Society America*, 7:923–932, 1990.
- [66] A.K. Jain and F. Farrokhnia. Unsupervised texture segmentation using gabor filters. *PR*, 24(12):1167 – 1186, 1991.
- [67] D.A. Clausi and M.E. Jernigan. Designing gabor filters for optimal texture separability. *PR*, 33(11):1835 – 1849, 2000.
- [68] J. Zhang, T. Tan, and L. Ma. L.: Invariant texture segmentation via circular gabor filters. In *16 th International Conference on Pattern Recognition (ICPR'02)*, 2002.
- [69] P. Ferraro, A. Wax, and Z. Zalevsky. *Coherent Light Microscopy: Imaging and Quantitative Phase Analysis*. Springer Series in Surface Sciences. Springer, 2011.
- [70] T.C. Poon and J.P. Liu. *Introduction to Modern Digital Holography: With Matlab*. Cambridge University Press, 2014.

- [71] N. Adie. *Digital In-line Holography with Extreme Ultraviolet Radiation: Master's Thesis*. Lund reports on atomic physics. Lund Institute of Technology, 2005.
- [72] L Denis, C Fournier, T Fournel, and C Ducottet. Numerical suppression of the twin image in in-line holography of a volume of micro-objects. *Measurement Science and Technology*, 19(7):074004, 2008.
- [73] D. Lange, C. Storment, C. Conley, and G. Kovacs. A microfluidic shadow imaging system for the study of the nematode *Caenorhabditis elegans* in space. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 107(2):904–914, June 2005.
- [74] SangJun Moon, Hasan Onur Keles, Aydogan Ozcan, Ali Khademhosseini, Edward Hæggstrom, Daniel Kuritzkes, and Utkan Demirci. Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11):3208–3214, 2009.
- [75] Ting-Wei Su, Sungkyu Seo, Anthony Erlinger, and Aydogan Ozcan. High-throughput lensfree imaging and characterization of a heterogeneous cell solution on a chip. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3):856–868, 2009.
- [76] S.B. Kim, D.M. Cropek, United States. Army. Corps of Engineers, Engineer Research, Development Center (U.S.), and Construction Engineering Research Laboratory (U.S.). *A Cell-based Biosensor for Real-time Detection of Cardiotoxicity Using Lensfree Imaging*. Royal Society of Chemistry, 2011.
- [77] Vicente Micó and Zeev Zalevsky. Superresolved digital in-line holographic microscopy for high-resolution lensless biological imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 15(4):046027–046027–5, 2010.
- [78] Nicolas Verrier, Clément Remacha, Marc Brunel, Denis LEBRUN, and Sebastien COETMELLE. Micropipe flow visualization using digital in-line holographic microscopy. *Optics Express*, 18(8):7807, March 2010.

- [79] Krzysztof Socha and Marco Dorigo. Ant colony optimization for continuous domains. *European Journal of Operational Research*, 185(3):1155–1173, 2008.
- [80] Bruce D. Lucas and Takeo Kanade. An iterative image registration technique with an application to stereo vision (ijcai). In *Proceedings of the 7th International Joint Conference on Artificial Intelligence (IJCAI '81)*, pages 674–679, April 1981.
- [81] Simon Baker and Iain Matthews. Lucas-kanade 20 years on: A unifying framework. *Int. J. Comput. Vision*, 56(3):221–255, February 2004.
- [82] David Schreiber. Generalizing the lucas?kanade algorithm for histogram-based tracking. *Pattern Recognition Letters*, 29(7):852 – 861, 2008.
- [83] Weiyuan Ni, Ngoc-Son Vu, and Alice Caplier. Lucas-kanade based entropy co-gealing for joint face alignment. *Image and Vision Computing*, 30(12):954 – 965, 2012.
- [84] Prashan Premaratne, Saboo Ajaz, and Malin Premaratne. Hand gesture tracking and recognition system using lucas?kanade algorithms for control of consumer electronics. *Neurocomputing*, 116(0):242 – 249, 2013. Seventh International Conference on Intelligent Computing (ICIC 2011).
- [85] Xiu Ying Wang, David Dagan Feng, and Jesse Jin. Elastic medical image registration based on image intensity. In *Proceedings of the Pan-Sydney Area Workshop on Visual Information Processing - Volume 11, VIP '01*, pages 139–142, Darlinghurst, Australia, Australia, 2001. Australian Computer Society, Inc.
- [86] O. Fluck, C. Vetter, W. Wein, A. Kamen, B. Preim, and R. Westermann. A survey of medical image registration on graphics hardware. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 104(3):e45 – e57, 2011.
- [87] P. Markelj, D. Tomazevic, B. Likar, and F. Pernus. A review of 3d/2d registration methods for image-guided interventions. *Medical Image Analysis*, 16(3):642 – 661, 2012. Computer Assisted Interventions.

- [88] Peihua Qiu and Chen Xing. Feature based image registration using non-degenerate pixels. *Signal Processing*, 93(4):706 – 720, 2013.
- [89] Herbert Bay, Andreas Ess, Tinne Tuytelaars, and Luc Van Gool. Speeded-up robust features (surf). *Computer Vision and Image Understanding*, 110(3):346 – 359, 2008. Similarity Matching in Computer Vision and Multimedia.
- [90] A. Ardeshir Goshtasby. *Image Registration - Principles, Tools and Methods*. Advances in Computer Vision and Pattern Recognition. Springer, 2012.
- [91] Marius Muja and David G. Lowe. Fast approximate nearest neighbors with automatic algorithm configuration. In *International Conference on Computer Vision Theory and Application VISSAPP'09*), pages 331–340. INSTICC Press, 2009.
- [92] Marius Muja and David G. Lowe. Scalable nearest neighbor algorithms for high dimensional data. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on*, 36, 2014.
- [93] Martin A. Fischler and Robert C. Bolles. Random sample consensus: A paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM*, 24(6):381–395, June 1981.
- [94] J. Petitot. An introduction to the mumford-shah segmentation model. *Journal of Physiology-Paris*, 97(2-3):335 – 342, 2003. Neurogeometry and visual perception.
- [95] D. Mumford and J. Shah. Optimal approximations by piecewise smooth functions and associated variational problems. *Pure Appl. Math.*, 1989.
- [96] T. Brox and D. Cremers. On local region models and a statistical interpretation of the piecewise smooth mumford-shah functional. *Int. J. Comput. Vision*, 84(2):184–193, 2009.
- [97] X. Du. Image segmentation and its applications based on the mumford-shah model. April 2011.



- [98] T. Chan and J. Shen. *Image Processing And Analysis: Variational, Pde, Wavelet, And Stochastic Methods*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA, USA, 2005.
- [99] Dennis Mitzel, Thomas Pock, Thomas Schoenemann, and Daniel Cremers. Video super resolution using duality based tv-l1 optical flow. In *Proceedings of the 31st DAGM Symposium on Pattern Recognition*, pages 432–441, Berlin, Heidelberg, 2009. Springer-Verlag.
- [100] Yoshihiko Mochizuki, Yusuke Kameda, Atsushi Imiya, Tomoya Sakai, and Takashi Imaizumi. Variational method for super-resolution optical flow. *Signal Processing*, 91(7):1535 – 1567, 2011.
- [101] Jian Lu, HongRan Zhang, and Yi Sun. Video super resolution based on non-local regularization and reliable motion estimation. *Signal Processing: Image Communication*, 29(4):514 – 529, 2014.
- [102] S.K. Nayar and Y. Nakagawa. Shape from Focus. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 16(8):824–831, Aug 1994.
- [103] Said Pertuz, Domenec Puig, and Miguel Angel Garcia. Analysis of focus measure operators for shape-from-focus. *Pattern Recognition*, 46(5):1415 – 1432, 2013.
- [104] Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. *Campbell Biology (9th Edition)*. Benjamin Cummings, 9 edition, October 2010.
- [105] M. Hourston, I.C. Potter, R.M. Warwick, and F.J. Valesini. The characteristics of the nematode faunas in subtidal sediments of a large microtidal estuary and nearshore coastal waters differ markedly. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94(1):68 – 76, 2011.
- [106] W.Z. Xu, S.G. Cheung, and Paul K.S. Shin. Structure and taxonomic composition of free-living nematode and macrofaunal assemblages in a eutrophic subtropical har-

- bour, hong kong. *Marine Pollution Bulletin*, 85(2):764 – 773, 2014. 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology.
- [107] Joel Rosenbaum. Chapter 1 - a stroll through time with chlamydomonas. In Elizabeth H. HarrisDavid B. SternGeorge B. Witman, editor, *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*, pages 1 – 14. Academic Press, London, second edition edition, 2009.
- [108] Ruixin Guo and Jianqiu Chen. Assessing the impacts of dimethoate on rotifers? reproduction through the pre-exposure history. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111(0):199 – 205, 2015.
- [109] Joseph C. Makarewicz and Theodore W. Lewis. Long-term changes in lake ontario rotifer abundance and composition: A response to cercopagis predation? *Journal of Great Lakes Research*, (0):–, 2015.
- [110] Carolina Noreña, Cristina Damborenea, and Francisco Brusa. Chapter 10 - phylum platyhelminthes. In James H. ThorpD. Christopher Rogers, editor, *Thorp andovich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)*, pages 181 – 203. Academic Press, Boston, fourth edition edition, 2015.
- [111] Ping Sun, John Clamp, Dapeng Xu, Yasushi Kusuoka, and Wei Miao. Vorticella linnaeus, 1767 (ciliophora, oligohymenophora, peritrichia) is a grade not a clade: Redefinition of vorticella and the families vorticellidae and astylozoidae using molecular characters derived from the gene coding for small subunit ribosomal {RNA}. *Protist*, 163(1):129 – 142, 2012.
- [112] Gaurav Misra, Richard B. Dickinson, and Anthony J.C. Ladd. Mechanics of vorticella contraction. *Biophysical Journal*, 98(12):2923 – 2932, 2010.